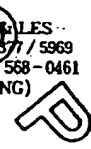


Y.S.CHANG & ASSOCIATES

K.P.O.BOX 136, SEOUL 110, KOREA

Member : AIPPI / PAA / ILES  
Fax : (82-2) 556-5577 / 5969  
Phone : 556-8224 ~ 8, 568-0461  
Telex : 24928 (YSCHANG)



FILE COPY  
提出書類写本

Kind of protection : PATENT

Applicant : NOVO NORDISK A/S

Title : C. Antarctica Lipase and Lipase Variants

Encl	Document filed	Filing Date	Kor. Appln. No.
X	Application 出願書	January 6, 1995	95-700043
	Petition for Exam 出願審査請求書		
X	Power of Attorney 委任狀	"	"
X	Priority Document 優先権主張書類	January 24, 1995	"
	Argument 意見書		
	Amendment 補正書		
	Printed Matter 審査参考資料		
	Appeal 抗告審判請求書		
Your Ref.No.		3748.204-KR, MPH/NRu	
Our Ref.No.		DK-4P-1219	

張龍植特許法律事務所  
韓國 Seoul 光化門郵遞局私書函136号



BEST AVAILABLE COPY

NZAS-0013894

99

TRANSLATION

Please be advised that the following Application Number has been assigned to this case by the Korean Industrial Property Office as below :

NOTICE OF APPLICATION NUMBER

TO : Y.S.Chang, Attorney  
 Appln. Date : July 5, 1993  
 Applicant : NOVO NORDISK A/S

Date: January 16, 1995  
 Appln. No.: KPA No. 95-700043  
 Request for Exam.: (yes, no)

Filing Date of : January 6, 1995  
 the Translation


Commissioner  
 Korean Industrial Property Office

Remarks

1. (Order of Examinations) Patent or Utility Model applications shall be examined in the order of the date Requesting Examination with the examination initiated only by formal Request. Design or trademark applications are automatically examined according to the filing dates.
2. (Request for Examination) The application shall be deemed withdrawn if the formal Request(Form No. 24 of the Patent Law Regulations) is not filed within 5 years of the Korean filing date for patents and 3 years for utility models.

Case	Official Fees for Requests for Examination
Patent Application	Basic fee : US\$96.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$22.00
Utility Model Application	Basic fee : US\$45.00, Additional fee for each claim in excess of one(1) : US\$12.00

3. (Recordal of Change) When the address or name of the applicant is changed, a request for recording the change(Form No. 4 of the Patent Law Regulations) must be immediately filed with the Korean Industrial Property Office.
4. (Payment of Official Fees) Payment of application or registration fees, etc. shall be made at any Korean National Treasury Bank in the official form required by then Korean Industrial Property Office ; one of the receipts issued by the bank should be attached to the relevant documents. Alternatively, a Postal Money Order in the required amount may replace the bank payment and receipt.
5. (Reference) For questions, please contact the Inquiry Department (Tel. 568-8150/64) or Application Department (Tel. 568-6079) of the Korean Industrial Property Office.
6. (Address of the Korean Industrial Property Office) 823-1 Yeoksam-dong, Kangnam-ku, Seoul, 135-784, Korea.



요금후납

관인생략

출원번호통지서  
(PCT)

Official Filing Certificate

우편엽서

1	3	5	0	8	0
---	---	---	---	---	---


받는사람 (대리인) 장용식

주소 서울시 강남구 역삼동 824-20(삼정빌딩)

출원일자 1993.07.05. 심사청구 (무) (원서기호 2화)

번역문제출일 1995. 1. 6

출원번호 1995년 특허출원 제 700043 호



출원인 : 노보노르디스크아크티에셀스카브

특 허 청 장

※ 이면참조

## PAPER PURSUANT TO ARTICLES 201 and 203 OF THE KOREAN PATENT LAW

Applicant	NOVO NORDISK A/S  Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark								
Attorney	Y. S. Chang J. S. Jeong	Code of Attorney	K020 K184						
Inventor(s)	<table border="0"> <tr> <td data-bbox="581 919 829 1037">           Allan SVENDSEN            Bakkeleddet 28            DK-3460 Birkerød            Denmark         </td> <td data-bbox="932 919 1219 1037">           Kim BORCH            Klerkegade 12.2.tv.            DK-1808 Copenhagen K            Denmark         </td> </tr> <tr> <td data-bbox="581 1073 883 1190">           Shankant Anant PATHAR            Christoffers Allé 91            DK-2800 Lyngby            Denmark         </td> <td data-bbox="932 1073 1179 1190">           Ib Groth CLAUSEN            Fyrrestien 6            DK-3400 Hillerød            Denmark         </td> </tr> <tr> <td data-bbox="581 1226 824 1344">           Michi EGEL-MITANI            Goengesletten 31            DK-2950 Vedbaek            Denmark         </td> <td data-bbox="932 1226 1208 1344">           Mogens Trier HANSEN            Mosevang 9            DK-3450 Lyngbe            Denmark         </td> </tr> </table>			Allan SVENDSEN Bakkeleddet 28 DK-3460 Birkerød Denmark	Kim BORCH Klerkegade 12.2.tv. DK-1808 Copenhagen K Denmark	Shankant Anant PATHAR Christoffers Allé 91 DK-2800 Lyngby Denmark	Ib Groth CLAUSEN Fyrrestien 6 DK-3400 Hillerød Denmark	Michi EGEL-MITANI Goengesletten 31 DK-2950 Vedbaek Denmark	Mogens Trier HANSEN Mosevang 9 DK-3450 Lyngbe Denmark
Allan SVENDSEN Bakkeleddet 28 DK-3460 Birkerød Denmark	Kim BORCH Klerkegade 12.2.tv. DK-1808 Copenhagen K Denmark								
Shankant Anant PATHAR Christoffers Allé 91 DK-2800 Lyngby Denmark	Ib Groth CLAUSEN Fyrrestien 6 DK-3400 Hillerød Denmark								
Michi EGEL-MITANI Goengesletten 31 DK-2950 Vedbaek Denmark	Mogens Trier HANSEN Mosevang 9 DK-3450 Lyngbe Denmark								
Title of Invention	C. Antarctica Lipase and Lipase Variants								
International Appln. Number	PCT/DK93/00225	International Filing Date	Jul. 5, 1993						

**TRANSLATION**

Priority Claim pursuant to Art. 54 of the Patent Law	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Appln. No.	Certified Document	
					attached	not attached
	Denmark	Patent	Jul. 6, 1992	0888/92		0

We are filing this document pursuant to Articles 201 and 203 of the Patent Law.

Jan. 6, 1995

Y. S. Chang  
Patent Attorney  
J. S. Jeong  
Patent Attorney

To : Commissioner  
Korean Industrial Property Office

**Attached Documents :**

1. Paper and Translation of Specification, Claims, Abstract and Drawings Each 3 copies
2. Power of Attorney with Translation Each 1 copy
3. Translation of Priority Document (will be filed)

<b>Official Filing Charges</b>	Application	basic fee	20 pages	₩20,000
		additional fee	33 pages	₩23,100
	Priority Claiming fee		Priority Application : 1 case	₩18,000
	Request for Examination fee			
	Total			₩61,100

특허법 제201조 및 제203조의 규정에 의한 서면 (2)

전수 이력	발명실사관		출원번호				
			담	당	심사관		
출원인	성명	노보 노르디스크 아크리에 실스카브 (NOVO NORDISK A/S)			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레					
대리인	성명	변리사 장용식, 정관상		대리인코드	K020, K184		
	주소	서울 강남구 역삼동 824-20 (전화번호 : 556-8224 ~6)					
발명자	성명	알탄 스펀트신			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-3480 비르케외트 박셀레외트 28					
	성명	살칸트 아난트 파타트			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-2800 명비 크리스토퍼스 알레 91					
	성명	미치 에젤- 미타니			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-2950 페르백 고인제슬레텐 31					
	성명	김 보르호			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-1808 코펜하겐 케이 올테르케가티 12.2.티브이.					
	성명	이브 그로프 클라우신			국적	덴마크	
	주소	덴마크 디케이-3400 엘레외트 피테스티인 6					
성명	모젠스 트리어 안신			국적	덴마크		
주소	덴마크 디케이-3450 명게 모시방 9						
발명의 명칭	칸다다 안락티카 리파아제 및 리파아제 변이체 (C. ANTARCTICA LIPASE AND LIPASE VARIANTS)						
국제출원번호	PCT/DK93/00225		국제출원일	1993. 7. 5.			
특허법 제54조 제55조의 규정에 의한 주요 사항	출원 국명	출원 종류	출원 일자	출원 번호	증명서류 첨부 미첨부		
	덴마크	특허	1992. 7. 6.	0888/92	O		
<p>특허법 제 201조 및 동법 제 203조의 규정에 의하여 위와 같이 지출합니다.</p> <p>1995년 1월 6일</p> <p>대리인 변리사 장용식</p> <p>대리인 변리사 정관상</p> <p>무어장장 귀하</p>							
첨부서류 : 1. 서면, 명세서번역문, 특허청구의 범위번역문, 요약서번역문, 도면번역문      각 3통 2. 위임장 및 동변역문              각 1통 3. 우선권서류 번역문 (수우지출)				수 수 료			
				출원료	기본	20편	20,000원
					가산	33편	23,100원
				우선권주장료		1건	18,000원
				심사청구료			
합 지			61,100원				

## 지정국(지역 또는 국가)현황

### 지역특허

- EP 유럽특허 : AT 오스트리아, BE 벨지움, CH and LI 스위스, 리히텐슈타인, DE 독일, DK 덴마크, ES 스페인, FR 프랑스, GR 그리스, GB 영국, IE 아일랜드, IT 이태리, LU 룩셈부르크, MC 모나코, NL 네델란드, PT 포르투갈, SE 스웨덴  
그의 유럽특허조약 및 PCT 계약국
- OA OAPI 특허 : 베냉 Benin, 브르키나파소 Burkina Faso, 카메룬 Cameroon, 중앙아프리카 공화국, Central African Republic, 차드 Chad, 콩고 Congo, 가봉 Gabon, 말리 Mali, 모리타니아 Mauritania, 니제르 Niger, 세네갈 Senegal, 토고 Togo, 그의 OAPI 회원국이며 PCT 계약국(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하시오.) .....

### 국내특허(다른 종류의 보호나 취급을 원할 경우에는 점선위에 기재하시오.)

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AT 오스트리아 Austria.....<br><input type="checkbox"/> AU 호주 Australia .....                            | <input type="checkbox"/> LU 룩셈부르크 Luxembourg .....                      |
| <input type="checkbox"/> BB 바베이도스 Barbados<br><input type="checkbox"/> BG 불가리아 Bulgaria .....                               | <input type="checkbox"/> MC 마다가스카르 Madagascar.....                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR 브라질 Brazil.....<br><input type="checkbox"/> BY 벨라루스 Belarus                          | <input type="checkbox"/> MN 몽고 Mongolia .....                           |
| <input type="checkbox"/> CA 캐나다 Canada<br><input type="checkbox"/> CH and LI 스위스, 리히텐슈타인<br>Switzerland, Liechtenstein..... | <input type="checkbox"/> MW 말라위 Malawi .....                            |
| <input type="checkbox"/> CZ 체크 Czech Republic.....<br><input type="checkbox"/> DE 독일 Germany .....                          | <input type="checkbox"/> NL 네델란드 Netherlands                            |
| <input type="checkbox"/> DK 덴마크 Denmark .....   | <input type="checkbox"/> NO 노르웨이 Norway                                 |
| <input type="checkbox"/> ES 스페인 Spain .....   | <input type="checkbox"/> NZ 뉴질랜드 New Zealand .....                      |
| <input type="checkbox"/> FI 핀란드 Finland .....   | <input type="checkbox"/> PL 폴란드 Poland .....                            |
| <input type="checkbox"/> GB 영국 United Kingdom   | <input type="checkbox"/> PT 포르투갈 Portugal .....                         |
| <input type="checkbox"/> HU 헝가리 Hungary .....   | <input type="checkbox"/> RO 루마니아 Romania                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 일본 Japan .....   | <input type="checkbox"/> RU 러시아연방 Russian Federation .....              |
| <input type="checkbox"/> KP 북한 Democratic People's<br>Republic of Korea .....   | <input type="checkbox"/> SD 수단 Sudan                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 대한민국 Republic of Korea .....   | <input type="checkbox"/> SE 스웨덴 Sweden                                  |
| <input type="checkbox"/> KZ 카자흐스탄 Kazakhstan.....   | <input type="checkbox"/> SK 슬로바키아 Slovakia .....                        |
| <input type="checkbox"/> LK 스리랑카 Sri Lanka  | <input type="checkbox"/> UA 우크라이나 Ukraine                               |
|   | <input checked="" type="checkbox"/> US 미국 United States of America..... |
|   | <input type="checkbox"/> VN 베트남 Viet Nam.....                           |
- 이 서식 발행이후 국내특허를 목적으로 PCT  
계약국이된 국가를 지정하는 경우에는 다음에  
기재하시오.
- .....
- .....

칸디다 안탁티카 리파아제 및 리파아제 변이체

도면의 간단한 설명

제 1도는 각각 비활성 (폐쇄) 형과 활성 (개방) 형일 경우의, WO 92/05249 에 기재된

H. lanuginosa 리파아제의 지질 접촉존의 삼차원 구조를 나타내는 컴퓨터 모델

이다. "백색" 잔기는 소수성 아미노산(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly

및 Met)을 나타내고, "황색" 잔기는 친수성 아미노산(Thr, Ser, Gln, Asn, Tyr

및 Cys)을 나타내고, "청색" 잔기는 양전하 아미노산(Lys, Arg 및 His) 을 나타

내며, "적색" 잔기는 음전하 아미노산(Glu 및 Asp) 을 나타낸다.

제 2도 및 제 3도는 발현 플라즈미드 pMT1229 의 구성에 대한 도식을 예시한다 (실시예

1 참조).

발명의 상세한 설명

발명의 분야

본 발명은 개선된 성질을 갖는 신규의 리파아제 호소 변이체, 본 변이체의 발현을

위해 암호화하는 DNA 구조체, 이 DNA 구조체로부터 본 변이체를 발현할 수 있는 숙주

세포, 그리고 이 숙주 세포의 배양에 의해 본 변이체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 본질적으로 순수한 칸디다 안탁티카(Candida antarctica) 제조함 리파아제

및 그 변이체, 그리고 이 리파아제 또는 그 변이체를 암호화하는 DNA 서열에 관한 것

이다.

## 발명의 배경

아주 여러가지의 미생물 및 포유류 기원의 리파아제가 알려져 있다. 이들 리파아제중 많은 것의 아미노산 서열은 밝혀져 있고 그 촉매 기능이 중요한 구조 및 기능 요소에 관하여 분석되어 있다 (예컨대 Vinkler et al., 1990 및 Schrag et al., 1991 참조). 지질 기질의 결합 및 활성화시 리파아제 효소는 형태 변화가 일어나서, 특히 활성 부위들 기질에 노출시키게 된다. 효소와 기질 사이의 추정된 상호작용과 함께 이러한 형태 변화가 특히 Brady et al., 1990, Brzozowski et al., 1991, Derewenda et al., 1992에 기재되어 있다.

많은 리파아제의 구조에 대한 지식에 기초하여, 제조할 DNA 법을 사용해서 개선된 성질을 가지는 리파아제 변이체를 구성하는 것이 가능했다. 그리하여 WO 92/05249에는 일정한 리파아제 변이체의 구성이 개시되어 있는데, 여기에서는 상이한 기질 특이성을 갖고 및/ 또는 지질 기질토의 리파아제 활성부위의 개선된 접근성을 갖는 변이체를 제공하기 위해 지질 접촉존이 변형되었다. 이 변형은 아미노산 치환에 의하여 정전하, 소수성 또는 지질 접촉존의 표면 형태를 변화시키게 된다.

리파아제의 구조와 기능 관계는 상기 인용 참조문헌에 기재된 바와 같은 많은 연구의 주제가 되어 오긴 했으나, 연구는 주로 기질 결합 및 활성화시의 리파아제의 거시적 특징에 집중되어온데 반하여, 기질 결합 및 촉매 활성화에 실제로 관련된 아미노산의 동일성은 단지 그보다 적은 정도로만 검토되어 왔다.

## 발명의 개시

많은 리파아제의 구조 및 활성도에 관한 분석을 겸한 서열 정렬 분석에 의해, 본 발명자들은 현재 놀랍게도 리파아제의 입계 위치의 일정 아미노산, 특히 트립토판의 존재가 최적 촉매 활성화에 중요한 것으로 보임을 알았다.



따라서 본 발명의 목적은 입계 위치에 위치한 아미노산 잔기를 증대된 비활성도를 가지는 변이체가 생기게 하는 아미노산 잔기에 의해 치환함으로써 입계 위치에 그러한 아미노산 잔기를 포함하지 않는 리파아제 (본 명세서에서는 이 리파아제를 모 리파아제 (parent lipases)라고 부른다) 를 변형시키는 것이다.

보다 구체적으로, 한 양태에 있어서 본 발명은 리파아제 분자의 소수성이 뛰어난 긴 결합포켓에 위치하고, 리파아제 구조체의 지질접촉존의 입계위치에 위치한 활성 세틴과 방향족 아미노산 잔기와 상이하며 가수분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용 하는 아미노산 잔기를 포함하는 트립신- 유사 촉매 삼체를 포함하는 모리파아제의 리파아제 변이체에서, 모리파아제의 것과 비교하여 증가된 비활성도를 제공하기 위하여 상기 아미노산 잔기가 방향족 아미노산 잔기로 치환된 리파아제 변이체에 관한 것이다.

본 명세서에서 "트립신- 유사"란 말은 모리파아제가 트립신의 활성 부위에 상당하는 활성 부위에 촉매 삼체, 즉 아미노산 Ser, His 및 Asp, Glu, Asn 또는 Gln 중의 하나를 포함하는 것을 가리켜 말한다.

리파아제는 트리글리세리드를 지방산, 글리세롤 및 디글리세리드 및/ 또는 모노글리세리드에 이르기까지 분해시킨다. 이 리파아제 작용은 기질 표면의 존재하 리파아제의 계면 활성화에 좌우된다. 활성화시 리파아제는 활성부위 부근의 영역에서 그 표면 소수성이 증가되는 방식으로 그 형태를 변화시킨다. 리파아제의 계면 활성화는 예컨대 Tilbeurgh et al., (1993) 에 의해 논의되었다.

지금까지 연구된 모든 리파아제는 리파아제가 비활성형일 경우 활성 세틴을 덮는 적어도 하나의 표면 루프구조체 (뚜껑 또는 덮개라고도 부름) 를 포함함을 알았다 (그러한 리파아제의 한 예가 Brady et al., 1990에 기재되어 있다). 리파아제가 활성화될 경우에는 그 루프 구조체가 이동되어, 활성부위 Ser 을 둘러싸는 표면을 만드는 활성 부위 잔기를 노출시키는데, 이것은 증가된 표면 소수성을 가지며 가수분해시 또는 가수

분해동안 지질 기질과 상호작용한다. 본 목적을 위해 이 표면은 임의로 루프 구조체 형태의, 이 표면내에 위치하거나 이 표면의 일부를 형성하는 아미노산 잔기물 포함하여 말하는, "지질 접촉존" 이라고 부른다. 이들 잔기는 지질 표면과 접촉하여 활성화될 때 리파아제가 지질상으로부터 트리글리세리드를 가수분해하는 가수분해시 또는 가수분해동안 기질과 리파아제의 상호작용에 관여할 수 있다.

지질 접촉존은 가수분해전 지질 기질이 결합하는 지질 접촉존의 일부인 지질 기질에 대한 결합 부위 (소위 결합 포켓) 를 포함한다. 이 결합 부위는 또 소위 가수분해 포켓을 포함하는데, 이것은 활성부위 Ser 주위에 위치하고, 여기서 지질 기질의 가수분해가 일어나는 것으로 생각된다. 오늘날까지의 모든 공지의 리파아제에서 지질 접촉존은 예컨대 적당한 컴퓨터 프로그램에 의해 만들어지는 리파아제의 삼차원 구조로부터 쉽게 인지된다. 활성 및 비활성 리파아제 각각의 형태가 이후 더 설명할 제 1도에 도시되어 있다.

본원에서, 리파아제 분자의 "임계 위치" 란 리파아제 분자의 지질 접촉존내 위치로, 이 위치는 지질 기질과 상호작용하고 방향족 아미노산 잔기와는 상이한 아미노산 잔기가 차지하고 있다.

또 하나의 개념에 있어서 본 발명은 본질적으로 기타 C. antarctica 물질이 없고

SEQ ID No.2 로 확인된 아미노산 서열을 포함하는 C. antarctica 리파아제 A, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1 로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한

누클레오티드 서열에 의해 암호화되는 그 변이체에 관한 것이다.

본 발명의 C. antarctica 리파아제 A는 산성 매에서의 활성 및 열안정성을 포함하여 많은 바람직한 성질을 가지고 있고, 여컨대 하기 절차를 이용하는 제조법 DNA 법에 의해 유리하게 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 리파아제 A는 WO 88/02775 에 기재되어 있는 야생형 C. antarctica로부터 정제된 C. antarctica 리파아제 A 보다 더 고순도로 그리고 더 다량으로 얻을 수 있다.

또한, 본 발명은 SEQ ID No.2 로 확인된 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열 또는 상기한 바와 같은 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 암호화하는 상기 DNA 서열의 변형에 관한 것이다.

본원에서는 "C. antarctica 리파아제 A" 를 "리파아제 A" 와 번갈아 사용하고 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 "리파아제 A 변이체" 라고 부른다.

본 발명은 또한 위에 지적한 바와 같은 리파아제 변이체를 암호화하는 DNA 서열 또는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체, 이 DNA 구조체를 함유하는 제조법 발현 벡터, 이 DNA 구조체 또는 발현 벡터에 의해 형성된 세포, 그리고 이 세포를 리파아제 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양하고, 그 후 배양물로부터 리파아제 변이체를 회수하는 본 발명 리파아제 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

그 모리파아제와 비교하여 증가된 비활성도를 가지는 본 발명의 리파아제 변이체는 보다 높은 그 비활성도로 인해 유리하게도 보다 적은 양으로 그 모리파아제와 동일한 목적으로 사용될 수 있음은 물론이다.

따라서, 본 발명은 세제 효소로서의; 소화 효소로서의; 에스테르 가수분해, 에스테르

합성 또는 에스테르 교환에 있어서의 본 발명 리파아제 변이체의 사용; 또는 예컨대 기계 펄프 제조공정에서와 기계 펄프를 사용하는 제지 공정에서 발생하는 피치 문제를 피하기 위한 본 리파아제 변이체의 사용에 관한 것이다.

#### 발명의 상세한 설명

상기한 바와 같이, 본 발명자들은 리파아제 분자의 기질 접촉점에 위치하는 일정 방향족 아미노산, 특히 트립토판의 존재가 최적 촉매 활성에 중요함을 발견했다.

방향족 아미노산 잔기 특히 트립토판 잔기의 존재의 중요성은 지질 접촉점내의 임계 위치, 즉 EP 0 305 216에 공개된 H. lanuginosa 리파아제의 아미노산 서열에서의 아미노산 번호 89 에 트립토판 잔기를 포함하는 Humicola lanuginosa 리파아제의 돌연변이체에 관한 연구와 관련하여 밝혀졌다. H. lanuginosa 돌연변이체에서 이 트립토판 잔기는 페닐

알라닌, 티로신, 히스티딘, 이소레우신, 글루탐산 및 글리신으로 각각 치환되었다.

이들 돌연변이체의 비활성도는 야생형 리파아제 100%로부터 페닐알라닌 돌연변이체 약 10% 까지 그리고 글리신 돌연변이체에 대해서는 약 2%에 이르기까지 증가함을 알았다 (위에 지시된 순서로).

어떤 이론에도 한정됨이 없이, 임계 위치, 예컨대 활성 세틴의 정상 또는 부근에 존재하는 아미노산 잔기는 a) 리파아제의 활성화동안 리파아제 및 기질로부터 생성된 4 면 중간체의 안정화, 및 b) 비활성 효소에 있어 활성 세틴을 덮는 뚜껑 부위의 치환 활성화에 관련될 수 있다고 현재 믿어진다. 트립토판이 이 위치에 존재할 경우 상기 a)뿐만 아니라 b)에 관해서도 최적 성능이 얻어진다고 예기된다.

따라서, 트립토판은 가장 안정한 4 면 중간체의 생성이 있게 하고 (이것은 일어날 촉매 작용에 필요한 활성화 에너지의 저하를 의미한다), 일어날 어떤 촉매작용에 필수적인 뚜껑 개방의 활성화에 관련하여 효소의 성능을 더 개선한다고 여겨진다.

상기 a)와 관련하여 최상으로 작용하는 리파아제 변이체는 측쇄에 불포화 고리계를 함유하고 있음을 관찰했다. 단연 최대 불포화계는 트립토판이고, 그 다음에 티로신, 페닐알라닌 그리고 히스티딘이다. 이들 측쇄는 활성부위 히스티딘 내지 세틴으로부터 두경 활성화 및 개방후 생성된 옥시아니온 구멍으로 양성자 전이가 일어난 4면 중간체를 생성하기 위해 낮은 활성화 에너지를 초래하는 촉매작용에 있어서의 양성자 전이에 중요할 수 있는 파이전자계("불포화")를 가지고 있다.

상기 이론상의 설명으로부터 임계 위치, 예컨대 활성 세틴의 정상 또는 부근에 존재할 최적 아미노산은 트립토판임을 알 수 있다. 그러나, 모리파아제가 이 위치에 어떤 방향족 아미노산 잔기 또는 측쇄에 불포화 고리계를 갖는 어떤 아미노산 잔기도 함유하지 않는 것일 경우에는, 그러한 아미노산이 이 위치에 치환되는 것이 유리할 수 있다.

따라서, 모리파아제가 임계 위치에, 측쇄에 불포화 고리계를 포함하지 않는 아미노산 잔기들 가지고 있을 경우에는, 그러한 불포화 고리계를 가지는 아미노산 잔기, 예컨대 방향족 아미노산 (트립토판, 티로신, 페닐알라닌 또는 히스티딘) 이 임계 위치에 치환될 수 있다. 모리파아제의 임계위치의 아미노산 잔기가 히스티딘일 경우는 페닐알라닌, 티로신, 가장 바람직하게는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있고, 아미노산 잔기가 티로신일 경우는 페닐알라닌, 가장 바람직하게는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있으며, 아미노산 잔기가 페닐알라닌인 경우는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있다.

몇몇 리파아제의 임계 위치는 지질 접촉근의 어떤 위치인 것으로 생각되나, 임계 위치는 보통 리파아제 분자의 결합 포켓내에, 바람직하게는 그 가수분해 포켓내에 위치한다. 대부분의 리파아제에 대해서는 임계 아미노산 잔기가 활성부위의 정상 또는 부근에 위치한다고 여겨진다.

이 위치를 차지하는 아미노산 잔기는 당해 리파아제의 아미노산 서열을 다른 리파아제의 아미노산 서열과 정렬시키고, 활성 세탄의 정상 또는 부근에 위치한 아미노산 잔기를 확인하여 추정된 상기 아미노산 잔기의 위치를 확인하는 서열 정렬에 관한 연구, 및/ 또는 2) 활성 세탄의 정상 또는 부근의 아미노산 서열을 확인하기 위한, INSIGHT (미국 샌디에이고, Biosym Technologies Inc.) 와 같은 표준 디스플레이 프로그램을 이용하는 당해 리파아제의 삼차원 구조에 관한 분석에 의해 어떤 리파아제에서든지 확인할 수 있다.

보다 구체적으로 말하면, 잘 알려진 기술에 따라 리파아제 좌표를 디스플레이하는 INSIGHT 와 같은 컴퓨터 프로그램에 기초하여, 지질 접촉존을 함유하는 리파아제 부분을 지적하는 것이 간단하다. 1/ 리파아제의 구조가 비활성화형이면, 지질 접촉존은 활성부위 Ser 의 축색방향에 의해 확인된다. 2/ 리파아제 구조가 활성화형이면, 확인은 기타 잔기와 상이한 색으로의 모든 소수성 잔기의 착색에 더욱 의거할 수 있다. 구조의 cpk 모델을 만드는 이러한 과정에 의해, 지질 접촉존에 특정한 소수성 표면이 확인될 수 있다. 활성부위 Ser 은 분자의 이러한 보다 소수성인 부분내에 위치한다.

몇몇 리파아제에 있어서 임계 아미노산 잔기는 활성 부위를 덮는 표면 루프 구조체, 또는 결합 포켓이나 가수분해 포켓과 같은 지질 접촉존의 표면 일부를 형성하는 것으로 밝혀진 하나 이상의 표면 루프구조체내에 위치한다.

임계 위치는 보통 단 한개의 아미노산 잔기로 구성된다고 생각하고 있으나, 더 증가된 비활성도를 얻기 위해서는, 두개 이상의 잔기를 바람직하게는 위에서 설명한 바와 같이 트립토판 잔기에 의해 치환하는 것이 바람직할 수 있다.

임계 위치에 트립토판 잔기를 가지지 않는 모리파아제의 비활성도를 여기에 게시된 바와 같은 변형에 의해 적어도 2 배, 예컨대 적어도 3, 바람직하게는 적어도 4 또는 심지어 5, 6 또는 7 배 증가시키는 것이 가능하다고 기대된다.

증가된 기질 특이성을 가지는 여기에 정의된 바와 같은 리피아제 변이체는 각종  
기원의 모리파아제에 기초하여 제조할 수 있다고 기대된다. 따라서, 모리파아제는  
미생물 리피아제 또는 포유류 리피아제일 수 있다.

모리파아제가 미생물 리피아제일 경우는 이스트, 예컨대 Candida, 리피아제, 박테리아,  
예컨대 Pseudomonas, 리피아제 또는 균류, 예컨대 Humicola 또는 Rhizomucor 리피아제  
중에서 선택될 수 있다.

한 바람직한 리피아제 변이체는 모리파아제가 Candida antarctica의 균주로부터 유도된  
것. 특히 모리파아제가 C. antarctica의 리피아제 A인 것. 바람직하게는 SEQ ID No.2로  
표시되는 아미노산 서열을 가지는 것 또는 여기에 정의된 바와 같은 그 리피아제 A  
변이체이다. C. antarctica 리피아제 A의 리피아제 변이체는 모리파아제의 페닐알라닌  
139가 트립토판 잔기로 치환된 SEQ ID No.2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것이  
바람직하다. 이 변이체의 구성 및 그 성질에 관한 분석은 실시예 3, 5 및 6에서  
논한다.

본 발명의 리피아제 변이체는 상술한 바와 같이 Pseudomonas 중, 예컨대 Ps. fragi의  
균주로부터 유도된 모리파아제에 기초하여 제조할 수 있다. 활성 세린의 정상  
또는 부근에 위치한 트립토판과 상이한 아미노산 잔기를 가지는 적합한 Ps. fragi의  
예는 Aoyama et al., 1988에 기재된 것이다. 본 발명에 따른 리피아제 변이체는  
SEQ ID No.3으로 표시되는 상기 리피아제의 아미노산 서열중 페닐알라닌 잔기 29를  
트립토판 잔기로 치환하여 구성할 수 있다.

본 발명의 리피아제 변이체의 구성을 위한 모리파아제로서 적합한 균류 리피아제의  
예는 Rhizopus, 특히 R. delemar 또는 R. niveus로부터 유도된 것으로, 이 후자의 아미

노산 서열은 예컨대 JP 64-80290 에 게시되어 있다. 이 모리파아제로부터 본 발명에 따른 리파아제 변이체를 구성하기 위해서는, 위치 117의 알라닌 잔기가 트립토판과 같은 방향족 아미노산 잔기에 의해 치환되어야 한다. 이하에 R. niveus 리파아제 서열 (SEQ ID No.5) 및 Rhizomucor miehei 리파아제 서열 (트립토판 잔기를 함유하는) (SEQ IN No.4)의 서열 정렬을 예시한다. 이 정렬로부터 R. niveus 리파아제의 임계 위치를 결정할 수가 있다.

서열	10	20	30	40	50	60 Res#	
	----- ----- ----- ----- ----- -----						
<u>mucor</u>	-----SIDGGIRAATSQEIINELTYTILSANSYCRIV						32
<u>niveus</u>	DDNLVGGMILDLPSDAPPISLSSSTINSASDGGKVAATTAQIQEFIKVAGIAATAYCRSV						60

서열	70	80	90	100	110	120 Res#	
	----- ----- ----- ----- ----- -----						
<u>mucor</u>	IPGAIWDCIHCDAE-DLKIILKIWSLTIYDINAMVARGDSEKITYIVFRGSSSIRNWIAD						91
<u>niveus</u>	VPGKRWDCVQCKWVFDGKLIITIFISLLSDINGYVLRSDKQKITIYLVFRGINSFRSAITD						120

서열	130	140	150	160	170	180 Res#	
	----- ----- ----- ----- ----- -----						
<u>mucor</u>	LITFVPVSYPPVSGIKVHRGFLDSYGEVQNELVATVLDQFKQYPSYKVAVTGHSLGGATAL						151
<u>niveus</u>	IVNFSDYKPKCAKVHAGFLSSYEQVNDYFPVVEQLTAHPTVKVIVIGHSLGGAQAL						180

서열	190	200	210	220	230	240 Res#	
	----- ----- ----- ----- ----- -----						
<u>mucor</u>	LCAIGLYQREGLSSSNLFLYTQQPRVGDPAFANYVSTGIPYRRTVNERDIVEHLPPA						211
<u>niveus</u>	LAGMDLYQREPRLSPKNLSIFIVGGPRVGNPTFAYVVESTGIPFQRTVHKRDIVEHPPQ						240



서열	250	260	270	280	290	300 Res#
muor	AFGFLHAGEEYWTIDNSPETVQVCISDLEISDCSNSIVPFTSVIDHLSYFGINIGLCS					269
niveus	SFGFLHPGVESWIKSGISN-VQICISELEIKDCSNSIVPFTSVIDHLSYFDINEGSCL					297

본 발명자들은 놀랍게도 위, 혀 또는 간 리파아제와 같은 비췌장 리파아제는 리파아제 분자의 임계 위치, 보통은 활성 세틴의 정상 또는 부근에 위치하는 것으로 확인된 아미노산 잔기가 트립토판과 상이하다는 공통 특징이 있음을 발견했다. 이것은 일반적으로 이 위치에 트립토판 잔기를 가지는 것으로 밝혀진 췌장 리파아제와 대조적이다. 따라서 본원에서는 비췌장 포유류 리파아제를 본 발명 리파아제 변이체의 구성을 위한 "모리파아제"로서 사용하는 것이 유리할 수 있다.

따라서, 포유류 기원의 것인 여기에 개시된 바와 같은 리파아제 변이체는 위, 혀 또는 간 기원과 같은 비췌장의 모리파아제로부터 제조되는 것이 유리하다. 그러한 포유류 리파아제는 사람, 쥐, 생쥐, 돼지, 개 또는 기타 포유류로부터 유도될 수 있다. 그러한 포유류 리파아제의 구체예로는 A23045로서 확인된 서열을 가지는 쥐 혀 리파아제 (Docherty et al., 1985), A27442로서 확인된 서열을 가지는 쥐 간 리파아제 (Komarony 및 Schotz, 1987), A33553으로서 확인된 서열을 가지는 사람 간 리파아제 (Datta et al., 1988), S07145로서 확인된 서열을 가지는 사람 위 리파아제 (Bodmer et al., 1987), 및 A37916으로서 확인된 서열을 가지는 Bio salt Activated Lipase (BSAL) (Baba et al., 1991)를 들 수 있는데, 이들 모두를 이후 예시한 서열정렬분석으로 임계위치에 관하여 분석했다. 이 서열정렬연구에 포함된 췌장 리파아제는 쥐과 췌장 리파아제, A34671 (Grusby et al., 1990), 돼지 췌장 리파아제, A00732 (Caro et al., 1981), 사람 췌장 리파아제, A34494 (Lowe et al., 1989), 및 서열 B24392를 가지는 개속 췌장 리파아제 (Mickel et al., 1989)였다. 언급한 리파아제 각각의 아미노산 서열은 상기한 등록 번호를 가지고 있고 공적으로 입수가 가능한 데이터 베이스로부터 입수가 가능하다.

42

89

A37916 TYGDEDCLYL NIWVPOGRK. . . QVSRDLPV MIWIYGGAFI MGS GHGANFL  
A23045 EVVTEDGYIL GYRIPHGKN NSENIGKRPV VYLOHGLIAS AT. . NWIANL  
S07145 EVVTEDGYIL EVNRIPYGRK NSGNIGQRPV VFLOHGLIAS AT. . NWISNL  
B24392 TNKNPNNFQT LLPSPSTIE ASNFQIDKKT RFTIHGFINK GE. ENWLLDM  
A34494 TNENPNNFQE VA. ADSSSIS GSNFKINRKT RFLIHGFIDK GE. ENWLANV  
A34671 TNENPNNYQI ISAIDPATIN ASNFQIDRKT RFLIHGFIDK GE. EGWLLDM  
A00732 TNQNQNNYQE LV. ADPSTIT NSNFRMDRKT RFLIHGFIDK GE. EDWLSNI  
A33553 GEINQ. . GCQ IRINHPTILQ EOGFNSSLPL VMCIHGWSVD GVLENWIWQM  
A27442 KDESRLGQQ LRPQHPETLQ EOGFNSSHPL VMCIHGWSVD GLEETWIWKI

90

130

A37916 NNYLYDGEEI AIRGNVIWVF FNYRVGFLGF LSTGDANLPG NYGLROQHMA  
A23045 PNNSLAFMLA DAGYDWWLGN SRGNWISRKN VYSPDSVEF WAFSFDMAK  
S07145 PNNSLAFILA DAGYDWWLGN SRGNWARRN LYSPDSVEF WAFSFDMAK  
B24392 CKMFKVEE. . . . . VN CICVDWKGS QTSYTOAANN VRVGAQVAQ  
A34494 CKNLFKVES. . . . . VN CICVDWKGS RIGYTOASQN IRTVGAEVAY  
A34671 CKMFKVEK. . . . . VN CICVDWKGS RIEYTOASYN TRVGAETAF  
A00732 CKNLFKVES. . . . . VN CICVDWKGS RIGYTOASQN IRTVGAEVAY  
A33553 VAALKSQPAQ P. . . . . VN VGLVDWITLA HDHYTLAVRN TRLVGKEVAA  
A27442 VGALKSRQSQ P. . . . . VN VGLVDWISLA YQHYALAVRN TRVVGQEVAA

131

175

A37916 IAWVKRNI. A AFGGDPNNIT | LFGESAGGAS | VSLQTLSPYN K. . . GLIRRA  
A23045 YDLPATINFI VQKIGQEKIH | YVGHSQGTTI | GFIAFSINPT L. . AKKIKTF  
S07145 YDLPATIDFI VKKIGQKQLH | YVGHSQGTTI | GFIAFSINPS L. . AKRIKTF  
B24392 MLSMLS. . . A NYSYSPSQVQ | LIGHSILGAHV | AGEAGSRIPG . . . IGRITGL  
A34494 FVEFLQ. . . S AFGYSPSNVH | VIGHSLGAHA | AGEAGRRIING T. . IGRITGL  
A34671 LVQVLS. . . T EMGYSPENVH | LIGHSILGSHV | AGEAGRRIING H. . VGRITGL  
A00732 FVEVLK. . . S SLGYSPSNVH | VIGHSLGSHA | AGEAGRRIING T. . IERITGL  
A33553 LLRWLE. . . E SVQLSRSHVH | LIGYSILGAHV | SGFAGSSIGG THKIGRITGL  
A27442 LLLWLE. . . E SMKFSRSKVH | LIGYSILGAHV | SGFAGSSMGG KRKIGRITGL

A37916 ISQSGVALSP WVIQKN.... ..PLFWAKKV AEKVGCPVGD AARMAQCLKV  
 A23045 YALAPVATVK YTQSPILKIS FIPITFLFKLM FGKMFPLPHT YFDDFLGTEV  
 S07145 YALAPVATVK YTKSLINKLR FVQSLFKFI FGDKIFYPHN FFDQFLATEV  
 B24392 DPVEASFQGT PEEVRLD... ..PTDADFVD VIHIDAAPLI PFLGFGTSQQ  
 A34494 DPAEPCFQGT PELVRLD... ..PSDAKFVD VIHIDGAPTV PNLGFGMSQV  
 A34671 DPAEPCFQGL PEEVRLD... ..PSDAMFVD VIHIDSAPII PYLGFMSQK  
 A00732 DPAEPCFQGT PELVRLD... ..PSDAKFVD VIHIDAAPII PNLGFGMSQT  
 A33553 DAAGPLFEGS APSNRLS... ..PDDASFVD AIHTFTREHM GLSVGIK.QP  
 A27442 DPAGPMFEGT SPNERLS... ..PDDANFVD AIHTFTREHM GLSVGIK.QP

Z = 덮개 부분

A37916 IDPRALITAY KVPLAGLEYP MLHYVGFVPV IDGDFIPADP INLYANAADI  
 A23045 CSREVLDLLC SNTLFIQGF DKKNLNVSRL DVYLGHNPAQ TSVQDFLHWA  
 S07145 CSREMLNLLC SNALFIQGF DSKNFNTSRL DVYLSHNPAG TSVQNMFWHT  
 B24392 MGHLDFFPNG GEEMPGCKKN ALSQIVNLDG IWEGTRDFVA CNHLRSYKYY  
 A34494 VGHLDFFPNG GVEMPGCKKN ILSQIVDIDG IWEGTRDFAA CNHLRSYKYY  
 A34671 VGHLDFFPNG GKEIPGOQKN ILSTIVDING IWEGTRNFAA CNHLRSYKYY  
 A00732 VGHLDFFPNG GKQMPGOQKN ILSQIVDIDG IWEGTRDFVA CNHLRSYKYY  
 A33553 IGHYDFYPNG GSFQPGCHFL ELYRHIAQHG FNATTQTIK. CSHERSVHLF  
 A27442 IAHYDFYPNG GSFQPGCHFL ELYKHIAEHG INATTQTIK. CAHERSVHLF

상술한 바와 같이 본 발명은 또한 SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는,

본질적으로 기타 C. antarctica 물질이 없는 C. antarctica 리파아제 A, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도

하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는

- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1 로 표시되는 전체 또는 부분

뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한

뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 그 변이체에 관한 것이다.

본원에서 "변이체"란 말은 SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는

C. antarctica 리파아제 A로부터 유도된 리파아제 A 변이체, 또는 자연적으로 생기는 변이체를 가리켜 말한다. 일반적으로 이 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연 리파아제 A와 상이한데, 이 잔기는 리파아제의 H 말단 끝 또는 C 말단 끝중의 하나 또는 둘다에서 삭제 또는 첨가되거나, 리파아제의 아미노산 서열내의 하나 이상의 부위에서 삽입 또는 삭제되거나, 리파아제의 아미노산 서열내에서 또는 그 한 끝이나 양 끝에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 치환되어 있을 수 있다.

또한, 본 발명의 변이체는 상술한 특징을 이루는 성질 1)-3) 중 한가지 이상을 가진다. 성질 1), 즉 변이체의 "리파아제 활성도"는 어떤 공지의 리파아제 평가분석, 예컨대 이후의 방법란에 기재한 표준 LU 평가분석을 이용하여 측정할 수 있다.

성질 2), 즉 이후의 SEQ ID No.2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있거나 이에 대항하여 발생하는 항체와 본 발명 변이체의 반응성은 공지의 방법, 예컨대 본 발명의 C. antarctica 리파아제 A에 의한 토커의 면역에 의해 생성된 다클론성 항체에 의해 측정할 수 있다.

항체 반응성은 본 기술분야에 공지된 평가분석을 사용하여 측정할 수 있는데, 그 예는 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 또는 방사상 면역확산 평가분석이다.

혼성화를 수반하는 상기 성질 3)은 그 아미노산 서열이 SEQ ID No.2로 확인된, C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 전체 또는 부분 cDNA 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오타이드 프로브를, 표준 혼성화 조건하에 수행되는 혼성화 실험에서 혼성화 프로브로서 사용하여 실험할 수 있다. 예컨대, 그러한 조건은 예컨대 5 x SSC 에서의 사전담금, 및 20% 포름아미드, 5 x Denhardt 용액, 50mM 인산나트륨, pH 6.8 및 50 $\mu$ g의 변성되고 초음파처리된 송아지 흉선 DNA의 용액중 ~40 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안의 사전 혼성화와, 이어서 100 $\mu$ M ATP가 보충된 동 용액중 ~40 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안의 혼성화를

수반하는 특정 조건하의 혼성화, 또는 예컨대 Sambrook et al., 1989 에 기재된 다른 방법이다.

올리고뉴클레오티드 프로브가 제조되는 것에 기초한 뉴클레오티드 서열은 편리하게는 SEQ ID No.1 로 표시되는 DNA 서열이다.

상기한 바와 같이, 추가 양태에 있어서 본 발명은 SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1 로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 C. antarctica 리파아제 A의 변이체 암호화하는 상기 DNA 서열의 변형에 관한 것이다.

DNA 서열의 적당한 변형의 예는 암호화 효소의 또 다른 아미노산 서열은 생기게 하지 않으나, DNA 서열이 도입되어 있는 숙주 유기체의 코돈 사용에 상당할 수 있는 뉴클레오티드 치환, 또는 상이한 아미노산 서열을 생기게 하나, 효소의 상술한 성질을 손상하지 않는 뉴클레오티드 치환이다. 가능한 변형의 다른 예는 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 삽입, 서열의 한 끝에서 하나 이상의 뉴클레오티드 첨가 및 서열의 한 끝 또는 서열내에서 하나 이상의 뉴클레오티드 삭제이다.

#### 본 발명의 리파아제 변이체 제조방법

유전자에 돌연변이를 도입하기 위한 몇가지 방법이 본 기술분야에 알려져 있다.

리파아제-암호화 DNA 서열의 클로닝에 관하여 간단히 논한 다음, 이 리파아제-암호화 서열내의 특정 부위에서 돌연변이를 발생시키기 위한 방법을 논한다.

#### 리파아제물 암호화하는 DNA 서열의 클로닝

모리파아제 또는 여기에 정의된 바와 같은 C. antarctica 리파아제 A물 암호화하는 DNA 서열은 당업계에 잘 알려진 각종 방법에 의해 당해 리파아제물 생성하는 어떤 세포 또는 미생물로부터든지 단리할 수 있다. 먼저 연구할 리파아제물 생성하는 유기체로부터의 염색체 DNA 또는 메신저 DNA 를 사용하여 게놈 DNA 및/ 또는 cDNA 라이브러리를 구성해야 한다. 그 다음, 리파아제의 아미노산 서열을 알았다면, 상동의 표지물 붙인 올리고뉴클레오티드 프로브를 합성하여 박테리아 DNA 의 게놈 라이브러리로부터 또는 균류 cDNA 라이브러리로부터 리파아제-암호화 클론을 확인하는데 사용할 수 있다. 대안으로, 박테리아 또는 균류의 또 다른 균주로부터의 리파아제와 상동인 서열을 함유하는, 표지물 붙인 올리고뉴클레오티드 프로브를, 보다 덜 엄격한 혼성화 및 세척 조건을 사용하여 리파아제-암호화 클론을 확인하는데 프로브로서 사용할 수도 있다.

리파아제 생성성 클론을 확인하기 위한 다시 또 하나의 방법은 생성한 게놈 DNA 라이브러리에 의해 리파아제-음성 박테리아를 형질전환시키는, 플라스미드와 같은 발현 벡터에 게놈 DNA 의 단편을 삽입하고, 그 다음 리파아제용 기질을 함유하는 한천상에 형질전환 박테리아를 석우는 것을 수반한다. 리파아제-함유 플라스미드를 함유하는 이들 박테리아는 분비 리파아제에 의한 기질의 소화로 인해, 깨끗한 한천의 후광으로 둘러싸인 클론을 생성한다.

대안으로, 효소물 암호화하는 DNA 서열은 기정의 표준 방법, 예컨대 S.L. Beaucage 및 M.H. Caruthers (1981) 에 의해 기재된 포스포아미디트법이나 Matthes 등 (1984) 에 의해

기재된 방법으로 합성하여 제조할 수도 있다. 포스포아미디트법에 따르면, 올리고 뉴클레오티드는 예컨대 자동 DNA 합성계로 합성, 정제, 어닐링, 결합 그리고 적당한 벡터로 클로닝시킨다.

최종적으로 DNA 서열은 표준기법에 따라, 전체 DNA 서열의 여러 부분에 해당하는 단편인, 합성계능 또는 cDNA 기원 (적당한 것으로서) 의 단편을 결합시킴으로써 제조된 혼합된 계능 및 합성, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 계능 및 cDNA 기원으로 되어 있을 수 있다. DNA 서열은 또한 예컨대 US 4,683,202 또는 R.K. Saiki 등 (1988) 에 기재된 바와 같이, 특정 프라이머를 사용하는 폴리머라제 사슬반응(PCR) 에 의해 제조할 수도 있다.

#### 리파아제-암호화 서열의 부위특이적 돌연변이 유발

일단 리파아제-암호화 DNA 서열을 단리하고 돌연변이에 바람직한 부위를 확인하면, 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 돌연변이를 도입할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 소정 돌연변이 부위에 접하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 돌연변이 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 합성동안 삽입한다. 특정 방법에서는, 리파아제-암호화 서열을 가교하는 DNA 의 단일가닥 갭을 리파아제 유전자를 함유하는 벡터내에 생성한다. 그 다음 소정 돌연변이를 함유하는 합성 뉴클레오티드를 단일가닥 DNA 의 상동부분에 어닐링시킨다. 그 다음 남아 있는 갭을 DNA 폴리머라제 I(Klenow 단편) 로 채우고, 구조체들 T4 리가아제를 사용하여 결합시킨다. 이 방법의 구체예는 Morinaga et al.(1984) 에 기재되어 있다. 미국특허 4,760,025호에는 카세트의 최소 변경을 행함으로써 다중 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 도입하는 것이 개시되어 있으나, 다양한 길이의 수많은 올리고뉴클레오티드가 도입될 수 있기 때문에, 모리나가(Morinaga)법에 의해 언제든지 한 때에 훨씬 더 다양한 돌연변이를 도입할 수 있다.

리파아제-암호화 서열에 돌연변이를 도입하는 또 하나의 방법이 Nelson and Long(1989)에 기재되어 있다. 그것은 PCR 반응에서 프라이머의 하나로서 화학적으로 합성한 DNA 가닥을 사용하여 도입된 소정 돌연변이를 함유하는 PCR 단편의 3 단계 발생을 수반한다. PCR 발생 단편으로부터, 돌연변이를 함유하는 DNA 단편을 제한 엔도뉴클레아제에 의한 분해에 의해 단리시켜 발현 플라스미드에 재삽입할 수 있다.

#### 리파아제 변이체의 발현

본 발명에 따르면, 상기한 방법 또는 당업계에 알려진 어떤 대체 방법에 의해 제조된 C. antarctica 리파아제 A-암호화 서열 또는 돌연변이 리파아제-암호화 서열은, 일반적으로 프로모터, 오퍼레이터, 리보솜 결합부위, 번역개시 시그널을 암호화하고, 임의로 리프레서 유전자 또는 각종 활성인자 유전자를 암호화하는 조절 서열을 포함하는 발현 벡터를 사용하여 호소형으로 발현시킬 수 있다. 발현 단백질의 분비를 가능케 하기 위해, "시그널 서열"을 암호화하는 뉴클레오티드를 리파아제-암호화 서열전에 삽입할 수 있다. 조절 서열 지도하의 발현을 위해서는, 본 발명에 따라 처리될 표적 유전자를 적당한 리딩 프레임내의 조절 서열에 사용가능하게 연결시킨다. 플라스미드 벡터에 혼입될 수 있고, 돌연변이 리파아제 유전자의 전사를 원조할 수 있는 프로모터 서열로는 원시핵생물의  $\beta$ -락타마아제 프로모터(Villa-Kamaroff et al., (1978)) 및 락크 프로모터(DeBoer et al., 1983)를 들 수 있으나 이것에 한정되지 않는다. 추가의 참조내용은 또한 "Useful proteins from recombinant bacteria" (1980)에 있다.

한 구체예에 따르면, Bacillus, 예컨대 B. subtilis, B. licheniformis 또는 B. lentus의 균주, 또는 E. coli의 균주는 리파아제 A 또는 돌연변이 DNA를 함유하는 발현벡터에 의해 형질전환된다. 발현이 B. subtilis와 같은 분비 미생물에서 일어나게 된다면,



시그널 서열은 번역계시 시그널에 뒤따르고 인터레스트의 DNA 서열에 선행할 수 있다. 시그널 서열은 그것이 분비시 발현 생성물로부터 분해되는 세포벽에 발현 생성물을 운반하는 작용을 한다. 위에서 정의한 "조절 서열"이란 많은 존재할 경우 시그널을 포함하여 말한다.

본 발명의 리파아제 또는 리파아제 변이체는 또한 숙주 세포를 가지는 이스트 세포를 사용하여 제조할 수도 있다. 적합한 이스트 숙주 세포의 예로는 S. cerevisiae 와 같은 Saccharomyces 의 균주, 또는 Hansenula, 예컨대 H. polymorpha 또는 Pichia, 예컨대 P. pastoris 의 균주를 들 수 있다.

본 발명의 리파아제 A 또는 리파아제 변이체를 제조하는 현재 바람직한 방법에서는, 숙주 유기체로서 섬유모양 균류를 사용한다. 섬유모양 균류 숙주 유기체는 편의상 제조합 단백질 제조용 숙주로서 이전에 사용되어온 것, 예컨대 A. niger, A. nidulans 또는 A. oryzae 와 같은 Aspergillus sp. 의 균주이다. 제조합 단백질의 제조에 A. oryzae 를 사용하는 것은 예컨대 EP 238 023에 광범위하게 기재되어 있다.

Aspergillus 에서의 리파아제 변이체의 발현을 위해, 리파아제 A 또는 리파아제 변이체에 대해 암호화하는 DNA 서열에 프로모터가 선행한다. 프로모터는 Aspergillus 에서 강한 전사활성을 발휘하는 어떤 DNA 서열이라도 좋고, 아밀라아제, 글루코아밀라아제, 프로테아제, 리파아제, 셀룰라아제 또는 당분해 효소와 같은 세포외 또는 세포내 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유도될 수 있다.

적합한 프로모터의 예는 A. oryzae TAKA 아밀라아제, Rhizomucor miehei 아스파르트산 프로테이나아제, A. niger 중성  $\alpha$ -아밀라아제, A. niger 산안정성  $\alpha$ -아밀라아제, A. niger

글루코아밀라아제, Rhizomucor miehei 리파아제, A. oryzae 알칼리 프로테아제 또는 A. oryzae

트리오스 포스페이트 아이소머타아제를 암호화하는 유전자로부터 유도된 것들이다.

특히 숙주 유기체가 A. oryzae 일 경우, 본 발명의 방법에 사용하기에 바람직한 프로모터는 A. oryzae TAKA 아밀라아제 프로모터로, 이유는 그것이 A. oryzae 에서 강한 전사 활성을 발휘하기 때문이다. TAKA 아밀라아제 프로모터의 서열은 EP 238 023에 있다.

중표 및 폴리아데닐화 서열은 프로모터와 동일한 공급원으로부터 적당히 유도될 수 있다.

균류 숙주세포를 형질전환하는데 사용되는 방법은 EP 238 023에 기재되어 있는 바와 같은 것이 적당할 수 있다.

숙주 세포로부터 리파아제 A 또는 리파아제 변이체를 확실히 분리시키기 위해, 자연적으로 생기는 시그널 서열일 수 있는 시그널 서열 또는 그 기능부 또는 세포로부터의 단백질 분비물 제공하는 합성 서열이, 리파아제 변이체들 암호화하는 DNA 서열에 선행할 수 있다. 특히 시그널 서열은 Aspergillus sp. 아밀라아제 또는 글루코아밀라아제들

암호화하는 유전자, Rhizomucor miehei 리파아제 또는 프로테아제들 암호화하는 유전자,

또는 Humicola 셀룰라아제, 크실라아제 또는 리파아제들 암호화하는 유전자로부터 유도할

수 있다. 시그널 서열은 A. oryzae TAKA 아밀라아제, A. niger 중성  $\alpha$ -아밀라아제,

A. niger 산안정성  $\alpha$ -아밀라아제 또는 A. niger 글루코아밀라아제들 암호화하는 유전자

로부터 유도되는 것이 바람직하다.

형질전환 숙주 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 Aspergillus 세포를 배양하는데

적합한 어떤 종류의 배지라도 좋다. 형질전환체는 보통 안정하고 선택 압력의

부재하여 배양할 수 있다. 그러나, 형질전환체가 불안정하다고 밝혀지면, 세포에 도입된 선택 마커를 선택에 사용할 수 있다.

숙주 세포로부터 분리된 숙성 리파아제 단백질은 세포를 배지로부터 원심분리 또는 여과에 의해 분리하고, 배지의 단백질 성분을 황산암모늄과 같은 염에 의하여 침전시키고, 이어서 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피법을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 배지로부터 편리하게 회수할 수 있다.

본 발명의 리파아제 변이체는 개선된 비활성도를 갖는, 그 모리파아제와 동일한 유형의 기질이 대해 활성이라고 기대되는 물론이다. 따라서, 본 발명의 리파아제 변이체는 그 모리파아제와 동일한 목적에 유용하다고 기대된다.

따라서, 세제 효소로서 유용한 모리파아제로부터 제조된 본 발명의 리파아제 변이체는 세제 첨가제 또는 세제 조성물에 활성 성분으로서 사용할 수 있다.

본 발명 리파아제 변이체의 또 하나의 기대되는 사용은 예컨대 낭포성 섬유증의 치료에 있어서 소화효소로서이다.

본 발명의 리파아제 변이체, 특히 C. antarctica 리파아제의 변이체의 세번째 사용은 에스테르 가수분해, 에스테르 합성 및 에스테르 교환과 같은 리파아제가 촉매작용하는 공정에서이다. 이들 공정에서의 리파아제의 사용은 WO 88/02775(노보 노트디스크 A/S)에 상세히 기술되어 있으며, 이 내용은 여기에 참고로 기재한다. 또한, C. antarctica는 불특정 리파아제이기 때문에, 예컨대 마가린 제조에서 임의추출용으로 사용할 수 있다. 또한 본 발명의 리파아제 변이체는 예컨대 PCT/DK92/00025 (노보 노트디스크 A/S)에 기재되어 있는 바와 같이, 기계펄프 제조공정 또는 기계펄프를 사용하는 제지공정에서 발생하는 피치문제를 피하는데 사용할 수 있으며, 이 내용은 여기에 참고로 도입된다.

다음에 본 발명을 첨부 도면을 참조하여 설명한다.

특허청구된 바와 같은 본 발명의 범위를 여하튼 한정하도록 의도되지 않은 다음 실시예에 본 발명을 더 예시한다.

### 재료

플라즈미드 및 미생물

pBoel777 (p777) (EP 0 489 718 에 기재됨)

p775 (이것의 구성은 EP 0 238 023에 기재됨)

pIC19H (Marsh et al., Gene 32 (1984), pp. 481-485)

pToC90 (WO 91/17243 에 기재됨)

Aspergillus oryzae A1580: IF0 4177

E. coli MT172 (K12 제한부족 E. coli MC1000 유도체)

### 일반 방법

리파아제 유전자의 부위특이적 시험관내 돌연변이 유발

리파아제 유전자에 돌연변이를 도입하기 위한 WO 92/05249 에 기재된 세가지 서로 다른 접근법, 즉 Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984)에 기재된 올리고 뉴클레오티드 부위특이적 돌연변이 유발, Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989)에 기재된 바와 같은 PCR 법, 그리고 리파아제-암호화 영역의 두 제한 부위 사이의 단편을 소정 돌연변이를 함유하는 합성 DNA 단편으로 치환하는 소위 "카세트 돌연변이 유발" 법을 사용할 수 있다. 마지막 방법의 사용은 실시예 2 에 예시되어 있다.

리파아제 비활성도의 측정

리파아제 활성도는 기질로서 글리세린 트리부티레이트를, 에멀션화제로서 아라비아 고무 물 사용하여 평가분석했다. 1LU (리파아제 단위) 는 30°C, pH 7.0에서 분당 적정가능

부티르산 1 $\mu$ mol 을 유리시키는 효소의 양이다. 리파아제 활성도는 코펜하겐 라디오미터의, 라디오미터 적정기 VIT90 을 사용하여 pH- 스타트에 의해 평가분석했다. 이 평가분석의 추가적인 세부사항은 요청시 입수가 가능한 Novo Analytical Method AF 95/5에 있다.

## 실시예

### 실시예 1

#### Candida antarctica 리파아제 A의 클로닝

C. antarctica 균주 LF058 (= 부다페스트 조약의 협정하에 1986. 9. 29 에 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)이 기탁하였고 또한 WO 88/02775 에 기재된 DSM 3855) 의 염색체 DNA 를, 동결 세포를 식염으로 분쇄하여 개방하고, 계속해서 본질적으로 Yelton et al., (1984) 에 기재된 바와 같이 DNA 를 추출함으로써 제조했다. 정제 DNA 를 Sau3A 에 의해 부분적으로 절단하고, 아가토오스 겔 전기영동후 3-9kb 범위내의 단편을 단리했다. Sau3A 크기의 단편을 BamHI-절단 디포스포릴화 플라스미드 pBR322 (New England Biolabs)도 결합시켰다. 결합 혼합물을 E. coli MT172 로 형질전환시켰다. 대략 50,000기의 형질전환 E. coli 콜론을 얻었는데, 이중 80% 는 LF058 DNA 의 삽입물을 함유했다.

표준 콜론 혼성화법 (Maniatis et al., 1982)을 사용하여, 콜론을  $^{32}P$ -포스포릴화 올리고뉴클레오티드 프로브 NOR 440 (SEQ ID No.7) 로 스크린하였다. NOR 440 은 속성 C. antarctica 리파아제 A (SEQ ID No.2)로부터 결정된 N 말단에 기초한 재발생 (84) 17 체이다. 34 콜론은 덜 엄격한 조건 (41 $^{\circ}$ C 및 6 x SSC)에서의 세척후 양성을 나타냈다. 플라스미드를 이들 콜론으로부터 제조하고 BstNI 에 의한 제한후 서던(Southern) 분석

했다. 서면용 프로브는 콜론성 혼성화 (위 참조) 에 사용된 NOR 440 프로브 (SEQ ID No.7) 또는 32P-표지의 프로브 NOR 438 (SEQ ID No.6) 였다. NOR 438은 13 위치에서 염기가 이스트 및 심유모양 균류에서의 코돈 사용에 기초하여 선택된 올리고뉴클레오티드 (게스머; guess mer)이다.

AACCCATACGACGACCC  
 T C T T T  
 G  
 T

NOR 440  
 (SEQ ID No. 7)

GCTGCTCTGCCTAACCCCTTACGACGACCCCTTTCTACACACCCC  
 T T T

NOR 438  
 (SEQ ID No. 6)

추측 위치들을 표시함.

단 하나의 플라즈미드, pMT1076 만이 덜 엄격한 조건 (위 참조) 에서 NOR 440 으로서 다소 더 엄격한 조건 (55°C 및 1 x SSC)에서 NOR 438 으로서 양자로 혼성화된 밴드들을 함유했다.

pMT1076 의 제한 지도를 그리고 맥삼-길버트(Maxam-Gilbert) 법으로 DNA 서열을 결정했다. 개방 리딩 프레임은 덮은 서열은 SEQ ID No.1 로 표시된다. 이 개방 리딩 프레임은 21 아미노산의 추정 시그널 서열을 암호화하고 (폰 하이네 규칙에 따라 (von Heijne, G. (1986)), 더욱 숙성 리파아제의 N 말단에 선행하는 10 아미노산의 프로펩티드를 암호화하는 것으로 보인다. 프로펩티드의 마지막 두 아미노산은 Arg Arg, 즉 S. cerevisiae KEX-2형의 효소에 의한 내단백질 분해 처리에 대한 전형적 분해 부위이다.

DNA 서열에 의해 암호화된 성숙 단백질 (위치 32 에서 출발하는) 의 아미노산 조성은 C. antarctica 리파아제 A에 대해 측정된 아미노산 조성과 일치한다 (다음 표 참조).

표 I

*C. antarctica* 리파아제 A의 아미노산 조성 (CALIP)

	DNA 서열로부터 추론함	아미노산 분석에 의함 (MC)
Ala	50	47
Arg	9	9
Asp/AsN	35	36
Cys	4	4
Gln/G1N	35	36
Gly	28	31
His	6	6
Ile	26	24
Leu	29	30
Lys	17	17
Met	2	3
Phe	20	19
Pro	33	33
Ser	26	27
Thr	27	28
Trp	5	4
Tyr	18	16
Val	27	26

제 2도 및 제 3도에 예시된 다수의 표준 플라즈미드 조작 (Maniatis et al., 1982) 을 통해, *C. antarctica* 리파아제 A의 개방 리딩 프레임은 *A. oryzae* 의 알파-아밀라아제 프로모터와 *A. niger*의 글루코아밀라아제 전사 종료체 사이의 정확한 배향에 위치시켰다. 생성한 발현 플라즈미드 pMT1229 를 EP 305,218에 기재된 바와 같이 *A. oryzae* A1560 으로 형질전환시켰다. 형질전환체를 위에 인용한 특허에 기재된 바와 같이 단리하여 성장시키고 비양 상정액을 *C. antarctica* 리파아제 A의 존재에 대해 분석했다.

실시예 2

*Candida antarctica* 리파아제 A의 F135W 변이체를 발현시키는 플라즈미드의 구성

A 246 bp BamHI/BssHII 단편을, PCR 반응으로 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 3117 을 사용하여 pMT1229 의 서열에 기초해서 시험관내에 합성했다. 프라이머 3117 은

별표를 한 135 phe 코돈 (TTC) 내지 trp 코돈 (TGG)에 BssHII 제한부위를 포함한다.

올리고뉴클레오타드 프라이머 3116 (F135W:256-276) (SEQ ID No. 8)  
5'-CAG AAC GAG GCG GTG GCC GAC-3'

올리고뉴클레오타드 프라이머 3117 (F135W:566-487) (SEQ ID No. 9)  
5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT TCG  
TAG CCA GCG ATG AAG GCG GCT TTC\* C\*AG CCT TCG TG-3'

PCR 반응은 다음 성분들을 혼합하고 혼합물을 HYBAID™ 열반응기에서 배양하여 행했다.

주형 pMT1229	10 ng/μl	1 μl
H <sub>2</sub> O		46.5 μl
10 x PCR 완충제		10 μl
2 mM dATP		10 μl
2 mM dTTP		10 μl
2 mM dCTP		10 μl
2 mM dGTP		10 μl
프라이머 3116	50.5 pmol/μl	1 μl
프라이머 3117	70.5 pmol/μl	1 μl
Taq 폴리머라제		0.5 μl
파라핀유		50 μl

단계 I	94°C	2 분	1 사이클
단계 II	94°C	30 초	
	50°C	30 초	30 사이클
	72°C	2 분	
단계 III	72°C	5 분	1 사이클

생성한 310 bp 단편을 전기영동후 2% 아가로오스 겔로부터 단리하고 BamHI 및 BssHII  
제한 효소로 소화시켰다. 생성한 264 bp BamHI/BssHII 단편을 마찬가지로 2% 아가  
로오스 겔로부터 단리했다. 그 다음 이 단편을

pMT1229	BamHI/XbaI	0.3 kb
pMT1229	BssHII/SphI	0.5 kb
pMT1229	SphI/XbaI	5.0 kb

와 결합시켰다.

결합 DNA 들 E. coli 균주 MT172 로 형질전환시켰다 보정 삼입물들을 함유한 형질  
전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀나아제 (Sequenase) (미합중국 바이오케미칼 (주))를  
사용하여 결정했다. 하나의 생성 플라즈미드 (pME 1178)는 아미노산 위치 135에 돌연  
변이를 함유했다 (phe 를 trp 로 돌연변이시킴).



pHE1178 을, 선택적 마커로서 *A. nidulans* 로부터의 *amdS* 유전자를 포함한 pToC90과 함께 WO 91/17243 에 기재된 방법을 이용하여 *A. oryzae* A1560 균주로 공동형질변환시켰다. *oryzae* 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2 회 재단리시키고 안정한 형질전환체를 항 *Candida* 리파아제 A 항체를 사용하여 록켓 면역전기영동에 의해 특징을 지었다. 형질전환체 (균주 MEA65) 에 의해 제조된 *Candida* 리파아제 A를 비활성도에 대해 더 분석했다.

### 실시예 3

*Candida antarctica* 리파아제 A의 F13PW 변이체를 발현시키는 플라스미드의 구성

A246 bp *Bam*HI/*Bss*HII 단편을, PCR 반응으로 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 3826을 사용하여 플라스미드 pMT1229 의 뉴클레오티드 서열에 기초해서 시험관내 합성했다. 프라이머 3826 은 별표들 한 139 phe 코돈 (TTC) 내지 trp 코돈 (TGG)에 *Bss*HII 제한부위 및 돌연변이를 포함한다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 은 실시예 2에 나타나 있다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3826 (F139W:566-487) (SEQ ID No. 10)  
 5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT TCG  
 TAG CCA GCG ATC\* C\*AG GCG GCT TTG AAG CCT TCG TG-3'

PCR 반응을 실시예 2에 기재된 방법으로 행했다. 310 bp 단편을 전기영동후 2% 아가로스 겔로부터 단리하고 *Bam*HI 및 *Bss*HII 제한효소에 의해 소화시켰다. 생성한 264 bp *Bam*HI/*Bss*HII 단편을 마찬가지로 2% 아가로오스 겔로부터 단리시켰다.

그 다음 이 단편을

pMT1229	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	0.3 kb
pMT1229	<i>Bss</i> HII/ <i>Sph</i> I	0.5 kb
pMT1229	<i>Sph</i> I/ <i>Xba</i> I	5.0 kb

과 결합시켰다.

결합 DNA 를 E. coli 균주 MT172 로 형질전환시켰다. 보정 삽입물을 함유한 형질 전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀나아제 (미합중국 바이오케미칼 (주))를 사용하여 결정했다. 하나의 생성 플라즈미드(pME1229) 는 아미노산 위치 139에 돌연변이를 함유했다 (phe 를 trp 로 돌연변이시킴).

pME1229 를 선택적 마커로서 A. nidulans 로부터의 amdS 유전자를 포함한 pToC90과 함께 A. oryzae A1560 균주로 공동형질변환시켰다. oryzae 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2 회 재단리시키고 안정한 형질전환체(MEA155)의 효소활성도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 기질로서 트리부틸렌을 사용하여 분석했다.

#### 실시예 4

Candida antarctica 리파아제 A의 F135W/F139V 변이체를 발현시키는 플라즈미드의 구성

A 248 bp BamHI/BssHII 단편을, PCR 반응에 의해 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 4224를 사용하여 시험관내 합성했다. 프라이머 4224 는 별표를 한 135 및 139 코돈 (TTC) 내지 trp 코돈 (TGG)에 BssHII 제한부위 및 돌연변이를 포함한다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 은 실시예 2에 나타났다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 4224 (F135W:566-487) (SEQ ID No. 11)  
 5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT TCG  
 TAG CCA GCG ATC\* C\*AG GCG GCT TTC\* C\*AG CCT TCG TG-3'

PCR 반응을 실시예 2에 있는 방법을 사용하여 행했다. 310 bp 단편을 전기영동후 2% 아가토오스 겔로부터 단리하고 BamHI 및 BssHII 제한효소에 의해 소화시켰다. 생성한 264 bp BamHI/BssHII 단편을 마찬가지로 2% 아가토오스 겔로부터 단리했다.

그 다음 이 단편을

pMT1229	BamHI/XbaI	0.3 kb
pMT1229	BssHII/SphI	0.5 kb
pMT1229	SphI/XbaI	5.0 kb

와 결합시켰다.

결합 DNA를 *E. coli* MT172로 형질전환시켰다. 삼입물을 함유한 형질전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀나제를 사용하여 결정했다. 한 결과 생성 플라스미드 (pME1230)는 아미노산 위치 135 및 139에 두 돌연변이를 함유했다 (phe를 trp로 돌연변이시킴).

pME1230을, 선택적 마커로서 *A. nidulans*로부터의 *andS* 유전자를 포함한 pToC90과 함께 *A. oryzae* A 1580 균주로 공동형질전환시켰다. *A. oryzae* 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2회 계단리시키고 안정한 형질전환체의 효소활성도를 실시예 5에 기재된 바와 같이 기질로서 트리부틸렌을 사용하여 분석했다.

#### 실시예 5

*C. antarctica* 리파아제 A 변이체 F139W 및 F135W/F139W의 정제 및 그 모 야생형

*C. antarctica* 리파아제 A와의 비활성도 비교

각각 실시예 3, 4 및 1에 기재된 바와 같이 제조된 모리파아제 및 리파아제 변이체를 다음의 4 단계 표준정제법을 사용하여 정제했다.

단계 1: 위 실시예 1 및 3에 기재된 형질전환 *A. oryzae* 세포를 배양하여 얻은 리파아제 및 리파아제 변이체 각각을 함유하는 발효즙을 원심분리하고, 상청액을 pH 7로 조절했다. 이온강도를 2mSi로 조절했다. DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) 겔을 25mM 트리스(Tris) 아세트산염 완충제 pH 7에서 팽창시키고 평행이 되게 했다. 발효상청액을 유리칼럼기상의 DEAE-Sephadex A-50에 통과시켰다. 리파아제 활성도를 가지는 폐액을 수집하고 0.8M 아세트산 암모늄으로 조절했다.

단계 2: 적당한 컬럼을 TSK 겔 ButylToyopearl 650C로 채우고 0.8M 아세트산암모늄에 의해 평행이 되게 했다. 리파아제 활성도를 가지는 폐액을 컬럼에 가했다.

결합된 물질을 물로 용리시켰다.

단계 3: 그 다음 리파아제 함유 용리액을 Highperformance Q-Sepharose 컬럼상에 가했다. 리파아제 활성도를 펩이드로서 수집했다. 이 방법으로 정제된 리파아제를 280nm 에서 1의 옵티컬 덴서티(Optical Density)로 농축시켰다.

리파아제의 순도를, 약 45 kD의 분자량을 갖는 한 띠를 보이는 SDS-PAGE에 의해 검사했다. 위 "일반 방법" 난에 기재된 방법을 사용하여 리파아제 활성도를 측정했다.

리파아제 변이체 F139W에 대해 1200 LU/OD<sub>280</sub>에 비해 야생형 모리파아제의 리파아제 활성도는 300 LU/OD<sub>280</sub>였다. 삼입 트립토판에 대한 보정을 안한 OD<sub>280</sub> 흡수에 의거, 돌연변이체의 비활성도는 사용된 평가분석에서 적어도 4배 더 높았다. 리파아제 변이체 F135W/F139W의 리파아제 활성도는 140 LU/OD<sub>280</sub>였다 (두 추가 트립토판에 대한 보정없이).

#### 실시에 6

*Candida antarctica* 리파아제 A 및 그 변이체 F139W의 열안정성

*C. antarctica* 리파아제 A 및 *C. antarctica* 리파아제 A 변이체의 열안정성을, 상이한 pH값에서 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimetry; DSC)에 의해 측정했다. 이 방법을 사용하여, 효소용액을 일정 프로그램된 속도로 가열하여 열변성온도 T<sub>d</sub>를 측정한다.

보다 구체적으로 말하면, MicroCal (주) 계 시차주사열량계 MC-20를 연구에 사용했다. 아래 표를 참조하여 50mM 완충용액으로 효소용액을 제조했다. 0.6 내지 0.9mg/ml의 범위에 걸친 효소농도와 약 1.2ml의 총부피를 각 실험에 사용했다. 모든 시료를 25°C에서 90°C/hr의 조사속도로 가열했다.

분석에서 얻어진 결과를 아래 표에 나타낸다.

C. ant. 리파아제 A (WT)

pH	완충제 (50 mM)	변성온도 <sup>1)</sup>
4.5	아세트산염	96°C
5	아세트산염	95°C
7	TRIS	93°C

C. ant. 리파아제 A 돌연변이체 (F139W)

pH	완충제 (50 mM)	변성온도 <sup>1)</sup>
5	아세트산염	84°C
7	TRIS	82°C

<sup>1)</sup> 존재하는 효소분자의 대략 절반이 가열동안 열적으로 변성된 온도.

위 결과는 C. antarctica 리파아제 A 및 F139W 변이체의 열안정성에 대한 pH 최적치가 대단히 낮고 양 효소가 pH 7 이하에서 열적으로 매우 안정함을 보여준다.

연구범위내에서 야생형과 돌연변이 F139W 양자의 열안정성은 pH가 저하됨에 따라 계속 증가한다. 이 때문에 양 리파아제는 대단히 높은 온도와 비교적 낮은 pH값에서의 가수분해/ 합성에 아주 적합하다.

본원에 인용된 참조문헌

- Winkler, F.K. et al., (1990), Structure of Human Pancreatic Lipase. *Nature*, vol. 343, 771-774,
- Schrag, J.D. et al., (1991), Ser-His-Glu triad Forms the Catalytic Site of the Lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*, vol. 351, 761-764,
- Brady, Leo et al., (1990), A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. *Nature*, vol 343, 767-770,
- Brzozowski, A.M. et al., (1991), A Model for Interfacial Activation in Lipases from the Structure of a Fungal Lipase-inhibitor Complex. *Nature*, vol. 351, 491-494,
- Derewenda, Urszula et al., (1992), Catalysis at the Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase. *Biochem.*, 31, 1532-1541,
- Tilbeurgh et al., *Nature*, Vol. 362, 814-820, (1993)
- Komaromy, M.C. et al., (1987), Cloning of Rat Hepatic Lipase cDNA: Evidence for a Lipase Gene Family. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 84, 1526-1530,
- Datta, S. et al., (1988) Human Hepatic Lipase. *J.Biol.Chem.*, 263, 1107-1110,
- Bodmer, M.W. et al., (1987) Molecular Cloning of a Human Gastric Lipase and Expression of the Enzyme in Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 909, 237-244.
- Baba, T. et al., (1991), Structure of Human Milk Bile Salt Activated Lipase. *Biochemistry*, 30, 500-510,

- Grusby, M.J. et al., (1990), Cloning of an Interleukin-4 Inducible Gene from Cytotoxic T Lymphocytes and its Identification as a lipase. *Cell* 60, 451-459,
- Caro, J.De. et al., (1981) Porcine Pancreatic Lipase. Completion of the Primary Structure. *Biochim.Biophys. Acta* 671, 129-138,
- Lowe, M.E. et al., (1989), Cloning and Characterization of Human Pancreatic Lipase cDNA. *J.Biol.Chem.*, 264, 20042-20048,
- Mickel, F.S. et al., (1989), Structure of the Canine Pancreatic Lipase Gene. *J.Biol.Chem.*, 264, 12895-12901,
- S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869,
- Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805
- R.K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491
- Morinaga et al., 1984, *Biotechnology* 2:646-639
- Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp. 147-151
- Villa-Kamaroff, et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731)
- DeBoer, et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25
- "Useful proteins from recombinant bacteria" in *Scientific American*, 1980, 242:74-94.
- Marsh et al., *Gene* 32 (1984), pp. 481-485)

- Docherty, A.J.P. et al., (1985), Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Rat Lingual Lipase cDNA. *Nucleic Acids Research*, 13, 1891-1903,
- Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, 1982,
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989,
- Zoller & Smith, *DNA*, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984),
- Nelson & Long, *Analytical Biochemistry*, 180, 147-151 (1989)
- von Heijne, G. *Nucl. Acid. Res.* 14 (1986), pp. 4683-90,
- Yelton et al., *PNAS* 81 (1984), pp. 1470-74,
- Aoyama, S. et al., (1988), Cloning, sequencing and expression of the lipase gen from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. *FEBS Lett.*, 242, 36-40,
- Derewenda, Zygmunt S. et al., (1992), Relationships Among Serine Hydrolases: Evidence for a Common Structural Motif in Triacylglyceride Lipases and Esterases,



서열 목록

(1) 일반 정보:

(i) 출원인:

- (A) 성명: 노보 노트디스크 아크티에셀스카브
- (B) 거리: 노보 알레
- (C) 도시: 박스베르트
- (E) 국적: 덴마크
- (F) 우편번호 (ZIP): 디케이-2880
- (G) 전화번호: +45 44448888
- (H) 팩스번호: +45 4449 3256.
- (I) 텔렉스번호: 37304

(ii) 발명의 명칭: 리파아제 변이체

(iii) 서열번호: 11

(iv) 컴퓨터 판독가능 형:

- (A) 매체 유형: 플로피 디스크
- (B) 컴퓨터: IBM PC 호환기종
- (C) 오퍼레이팅 시스템: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 소프트웨어: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.25 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 1389 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (계놈)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 없음

(v) 단편 유형: 내부

(vi) 원공급원

- (A) 유기체: 칸디타 안탁티카
- (C) 개체 단리물: DSM 3855

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 1:

ATGGGAGTGT CCTTGGGCTC CATCAGTGG CTGCTTGGG OGGCAOCCG GGCTGTGCTC	60
GOGGCTOCCG OGGGOGAGAC GCTGGACCGA CGGGGCGGCG TGCCCAACC CTAOGACGAT	120
CCCTTCTACA CGAOGCCATC CAACATGGC AGGTTTGGCA AGGGCCAGGT GATCCAATCT	180
CGCAAGGTGC CCAOCCGACAT OGGCAOCCG AACAAOCCG CTGCTGGTTCCA GCTGCAGTAC	240

CGCACCAACA ATACGCAGAA CGAGGOGGTG GCGAOGTGG CCACOGTGTG GATCCCGGC	300
AAGCCCGCTT CGCGCCAA GATCTTTTGG TACCAGTCT ACGAGGATGC CACGGGCTC	360
GACTGTGCTC CGAGCTACAG CTACTCACT GGATTGGACC AGCGAACAA GGTGAAGGG	420
GTGCTOGACA CGCCATCAT CATGGCTGG GCGCTGCAGC AGGGCTACTA CGTGTCTOG	480
TOGACCAAG AAGGCTTCAA AGCGGCTTC ATCGCTGGCT ACGAAGAGGG CATGGCTATC	540
CTOGAAGCA TOGCGGCT CAAGAACTAC CAGAACCTGC CATCCGACAG CAAGGTGGCT	600
CTTGAGGGCT ACAGTGGGG AGCTCACGCC ACCGTGTGG CGACTTGGCT TGCTGAATCG	660
TACGGCCCG AGCTCAACAT TGTGGTGGCT TCGAAGGG GCAAGCCCGT GAGCGCCAAG	720
GACACCTTCA CATTCTCAA CGGCGACCC TTGGCCGGCT TTGCCCTGGC GGGTGTCTOG	780
GGTCTCTGCG TGGCTCATCC TGATATGGAG AGCTTCATG AGGCCCGATT GAACGCCAAG	840
GGTCAGCGA CGCTCAAGCA GATCCGGGC GTGGCTCTT GCGTGGCGA GGTGGTGTG	900
ACCTACCCCT TCTCAACGT CTCTGGCTG GTCAACGACA CGAACCTGCT GAATGAGGG	960
CCGATCGCTA GCATCTCAA GCAGGAGACT GTGGTCCAG CGAAGCGAG CTACACGGTA	1020
TOGGTGGCCA AGTCCCGCG CTTCATCTGG CATGGATCC CGAGCGAGAT CGTGGCTAC	1080
CAGCCTGGG CTACTACGT CAAGGAGCAA TGTGCCAAG GCGCCAACAT CAATTTTTGG	1140
CCCTACCGA TOGCGAGCA CCTCAAGCC GAGATCTTTG GTCTGGTGGC TAGCCTGTGG	1200
TTTATCAAGC AAGCCTTGA CGGCACCACA CCAAGGTGA TCTGGGGCAC TOCCATCCCT	1260
GCTATGCTG GCATCACCAC GCGCTGGGG GACCAAGTGC TGGGTGGGA CCTGGCCAAC	1320
CAGCTGGCA GCGTGGCG CAAGCAGAGT GCGTGGGA AGCCCTTTGG CCGCATCACA	1380
CCACCTTAG	1389

(2) SEQ ID NO: 2에 대한 정보:

- (i) 서열 특징:
  - (A) 길이: 463 아미노산
  - (B) 유형: 아미노산
  - (C) 가닥: 단일
  - (D) 로폴로저: 선형
- (ii) 분자 유형: 단백질
- (iii) 가설: 없음
- (iii) 안티-센스: 없음
- (v) 단편 유형: N 말단

(vi) 원 공급원

(A) 유기체: *Candida antactica*

(c) 개체 단리물: DSN 3855

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Val Ser Leu Arg Ser Ile Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Thr  
1 5 10 15  
Ala Ala Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Thr Leu Asp Arg Arg Ala  
20 25 30  
Ala Leu Pro Asn Pro Tyr Asp Asp Pro Phe Tyr Thr Thr Pro Ser Asn  
35 40 45  
Ile Gly Thr Phe Ala Lys Gly Gln Val Ile Gln Ser Arg Lys Val Pro  
50 55 60  
Thr Asp Ile Gly Asn Ala Asn Asn Ala Ala Ser Phe Gln Leu Gln Tyr  
65 70 75 80  
Arg Thr Thr Asn Thr Gln Asn Glu Ala Val Ala Asp Val Ala Thr Val  
85 90 95  
Trp Ile Pro Ala Lys Pro Ala Ser Pro Pro Lys Ile Phe Ser Tyr Gln  
100 105 110  
Val Tyr Glu Asp Ala Thr Ala Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ser Tyr  
115 120 125  
Leu Thr Gly Leu Asp Gln Pro Asn Lys Val Thr Ala Val Leu Asp Thr  
130 135 140  
Pro Ile Ile Ile Gly Trp Ala Leu Gln Gln Gly Tyr Tyr Val Val Ser  
145 150 155 160  
Ser Asp His Glu Gly Phe Lys Ala Ala Phe Ile Ala Gly Tyr Glu Glu  
165 170 175  
Gly Met Ala Ile Leu Asp Gly Ile Arg Ala Leu Lys Asn Tyr Gln Asn  
180 185 190  
Leu Pro Ser Asp Ser Lys Val Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Gly Gly Ala  
195 200 205  
His Ala Thr Val Trp Ala Thr Ser Leu Ala Glu Ser Tyr Ala Pro Glu  
210 215 220  
Leu Asn Ile Val Gly Ala Ser His Gly Gly Thr Pro Val Ser Ala Lys  
225 230 235 240  
Asp Thr Phe Thr Phe Leu Asn Gly Gly Pro Phe Ala Gly Phe Ala Leu  
245 250 255  
Ala Gly Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala His Pro Asp Met Glu Ser Phe

260	265	270
Ile Glu Ala Arg Leu Asn Ala Lys Gly Gln Arg Thr Leu Lys Gln Ile		
275	280	285
Arg Gly Arg Gly Phe Cys Leu Pro Gln Val Val Leu Thr Tyr Pro Phe		
290	295	300
Leu Asn Val Phe Ser Leu Val Asn Asp Thr Asn Leu Leu Asn Glu Ala		
305	310	315
Pro Ile Ala Ser Ile Leu Lys Gln Glu Thr Val Val Gln Ala Glu Ala		
325	330	335
Ser Tyr Thr Val Ser Val Pro Lys Phe Pro Arg Phe Ile Trp His Ala		
340	345	350
Ile Pro Asp Glu Ile Val Pro Tyr Gln Pro Ala Ala Thr Tyr Val Lys		
355	360	365
Glu Gln Cys Ala Lys Gly Ala Asn Ile Asn Phe Ser Pro Tyr Pro Ile		
370	375	380
Ala Glu His Leu Thr Ala Glu Ile Phe Gly Leu Val Pro Ser Leu Trp		
385	390	395
Phe Ile Lys Gln Ala Phe Asp Gly Thr Thr Pro Lys Val Ile Cys Gly		
405	410	415
Thr Pro Ile Pro Ala Ile Ala Gly Ile Thr Thr Pro Ser Ala Asp Gln		
420	425	430
Val Leu Gly Ser Asp Leu Ala Asn Gln Leu Arg Ser Leu Asp Gly Lys		
435	440	445
Gln Ser Ala Phe Gly Lys Pro Phe Gly Pro Ile Thr Pro Pro Glx		
450	455	460

(2) SEQ ID NO: 3에 대한 정보:

- (i) 서열 특징:
  - (A) 길이: 277 아미노산
  - (B) 유형: 아미노산
  - (C) 가닥: 단일
  - (D) topology: 선형
- (ii) 분자 유형: 단백질
- (iii) 가설: 없음
- (iii) 안티-센스: 없음
- (v) 단편 유형: 내부
- (vi) 원 공급원:

(A) 유기체: *Pseudomonas fragi*

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 3:

Met Asp Asp Ser Val Asn Thr Arg Tyr Pro Ile Leu Leu Val His Gly  
1 5 10 15  
Leu Phe Gly Phe Asp Arg Ile Gly Ser His His Tyr Phe His Gly Ile  
20 25 30  
Lys Gln Ala Leu Asn Glu Cys Gly Ala Ser Val Phe Val Pro Ile Ile  
35 40 45  
Ser Ala Ala Asn Asp Asn Glu Ala Arg Gly Asp Gln Leu Leu Lys Gln  
50 55 60  
Ile His Asn Leu Arg Arg Gln Val Gly Ala Gln Arg Val Asn Leu Ile  
65 70 75 80  
Gly His Ser Gln Gly Ala Leu Thr Ala Arg Tyr Val Ala Ala Ile Ala  
85 90 95  
Pro Glu Leu Ile Ala Ser Val Thr Ser Val Ser Gly Pro Asn His Gly  
100 105 110  
Ser Glu Leu Ala Asp Arg Leu Arg Leu Ala Phe Val Pro Gly Arg Leu  
115 120 125  
Gly Glu Thr Val Ala Ala Ala Leu Thr Thr Ser Phe Ser Ala Phe Leu  
130 135 140  
Ser Ala Leu Ser Gly His Pro Arg Leu Pro Gln Asn Ala Leu Asn Ala  
145 150 155 160  
Leu Asn Ala Leu Thr Thr Asp Gly Val Ala Ala Phe Asn Arg Gln Tyr  
165 170 175  
Pro Gln Gly Leu Pro Asp Arg Trp Gly Gly Met Gly Pro Ala Gln Val  
180 185 190  
Asn Ala Val His Tyr Tyr Ser Trp Ser Gly Ile Ile Lys Gly Ser Arg  
195 200 205  
Leu Ala Glu Ser Leu Asn Leu Leu Asp Pro Leu His Asn Ala Leu Arg  
210 215 220  
Val Phe Asp Ser Phe Phe Thr Arg Glu Thr Arg Glu Asn Asp Gly Met  
225 230 235 240  
Val Gly Arg Phe Ser Ser His Leu Gly Gln Val Ile Arg Ser Asp Tyr  
245 250 255  
Pro Leu Asp His Leu Asp Thr Ile Asn His Met Ala Arg Gly Ser Ala  
260 265 270

Gly Ala Ser Thr Arg  
275

(2) SEQ ID NO: 4에 대한 정보:

- (i) 서열 특징:
  - (A) 길이: 269 아미노산
  - (B) 유형: 아미노산
  - (C) 가닥: 단일
  - (D) 토폴로지: 선형
- (ii) 분자 유형: 단백질
- (iii) 가설: 없음
- (iii) 안타-센스: 없음
- (v) 단편 유형: 내부
- (vi) 원 공급원:
  - (A) 유기체: *Rhizomucor miehei*

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 4:

Ser	Ile	Asp	Gly	Gly	Ile	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Glu	Ile	Asn	Glu	
1				5					10					15		
Leu	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Ser	Tyr	Cys	Arg	Thr	Val	
			20					25					30			
Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Trp	Asp	Cys	Ile	His	Cys	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
		35					40					45				
Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Thr	Trp	Ser	Thr	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Asn	Ala	
	50					55					60					
Met	Val	Ala	Arg	Gly	Asp	Ser	Glu	Lys	Thr	Ile	Tyr	Ile	Val	Phe	Arg	
65					70					75					80	
Gly	Ser	Ser	Ser	Ile	Arg	Asn	Trp	Ile	Ala	Asp	Leu	Thr	Phe	Val	Pro	
				85					90					95		
Val	Ser	Tyr	Pro	Pro	Val	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	His	Lys	Gly	Phe	Leu	
			100					105					110			
Asp	Ser	Tyr	Gly	Glu	Val	Gln	Asn	Glu	Leu	Val	Ala	Thr	Val	Leu	Asp	
		115					120					125				
Gln	Phe	Lys	Gln	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Lys	Val	Ala	Val	Thr	Gly	His	Ser	
		130				135					140					
Leu	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Arg	
145					150					155					160	
Glu	Glu	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Asn	Leu	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gln	Gly	Gln	

Pro Arg Val Gly Asp Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Val Ser Thr Gly	165	170	175
180	185	190	
Ile Pro Tyr Arg Arg Thr Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu	195	200	205
Pro Pro Ala Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Tyr Trp Ile	210	215	220
Thr Asp Asn Ser Pro Glu Thr Val Gln Val Cys Thr Ser Asp Leu Glu	225	230	235
Thr Ser Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Leu Asp	245	250	255
His Leu Ser Tyr Phe Gly Ile Asn Thr Gly Leu Cys Ser	260	265	

(2) SEQ ID NO: 5에 대한 정보:

- (i) 서열 특징:
  - (A) 길이: 297 아미노산
  - (B) 유형: 아미노산
  - (C) 가닥: 단일
  - (D) 토폴로지: 선형
- (ii) 분자 유형: 단백질
- (iii) 가설: 없음
- (iii) 안티-센스: 없음
- (v) 단편 유형: 내부
- (vi) 원 공급원:
  - (A) 유기체: *Rhizopus niveus*

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 5:

Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu Asp Leu Pro Ser Asp Ala	1	5	10	15
Pro Pro Ile Ser Leu Ser Ser Ser Thr Asn Ser Ala Ser Asp Gly Gly	20	25	30	
Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile Gln Glu Phe Thr Lys Tyr	35	40	45	
Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg Ser Val Val Pro Gly Asn	50	55	60	
Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp Val Pro Asp Gly Lys Ile	65	70	75	80

Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp Thr Asn Gly Tyr Val Leu  
 85 90 95  
 Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu Val Phe Arg Gly Thr Asn  
 100 105 110  
 Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val Phe Asn Phe Ser Asp Tyr  
 115 120 125  
 Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala Gly Phe Leu Ser Ser Tyr  
 130 135 140  
 Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val Val Gln Glu Gln Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly  
 165 170 175  
 Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu Tyr Gln Arg Glu Pro Arg  
 180 185 190  
 Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr Val Gly Gly Pro Arg Val  
 195 200 205  
 Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ser Thr Gly Ile Pro Phe  
 210 215 220  
 Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val Pro His Val Pro Pro Gln  
 225 230 235 240  
 Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Ser Trp Ile Lys Ser Gly  
 245 250 255  
 Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu Ile Glu Thr Lys Asp Cys  
 260 265 270  
 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile Leu Asp His Leu Ser Tyr  
 275 280 285  
 Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu  
 290 295

(2) SEQ ID NO: 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 44 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)



(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 없음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 6:

GCTGCTCTGC CTAACCCCTA CGAYGAYCCT TTCTACACCA CCCC

44

(2) SEQ ID NO: 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 17 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥: 단일

(D) topology: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 없음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 7:

AAYCCNTAYG AYGAYCC

17

(2) SEQ ID NO: 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 21 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 가닥: 단일

(D) topology: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 없음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 8:

CAGAACGAGG CCGTGGCOGA C

21

(2) SEQ ID NO: 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 80 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 있음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 9:

TTCCTGAGCG CGGGATGOC GTGAGGATA GCCATGCCCT CTTGTAGCC AGOGATGAAG 60

GCGCCTTCC AGCCTTGIG 80

(2) SEQ ID NO: 10에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 80 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 있음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 10:

TTCCTGAGCG CGGGATGOC GTGAGGATA GCCATGCCCT CTTGTAGCC AGOGATCCAG 60

GCGCCTTGA AGCCTTGIG 80

(2) SEQ ID NO: 11에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

- (A) 길이: 80 염기쌍
- (B) 유형: 핵산
- (C) 가닥: 단일
- (D) 토폴로지: 선형

(ii) 분자 유형: DNA (합성)

(iii) 가설: 없음

(iii) 안티-센스: 있음

(v) 단편 유형: 내부

(xi) 서열 설명: SEQ ID NO: 11:

```
TTCTTGAGCG CGGGATGCC GTGAGGATA GCCATGCCCT CTGGTAGCC AGGATCCAG 60
GGGCTTTC AGCCTTGTG 80
```

## 특허청구의 범위

1. 리파아제 분자의 소수성이 뛰어난 긴 결합포켓에 위치하고, 리파아제 구조체의 지질접촉존의 입계위치에 위치한 활성 세틴과 방향족 아미노산 잔기와 상이하며 가수분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용하는 아미노산 잔기를 포함하는 트립신- 유사 촉매 삼체를 포함하는 모리파아제의 리파아제 변이체에서, 모리파아제의 것과 비교하여 증가된 비활성도를 제공하기 위하여 상기 아미노산 잔기가 방향족 아미노산 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
2. 제 1항에 있어서, 입계위치에 삽입되는 방향족 아미노산 잔기는 트립토판, 페닐알라닌, 티로신 및 히스티딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
3. 제 1항 또는 제 2항에 있어서, 방향족 아미노산 잔기와 상이한 상기 아미노산 잔기는 페닐알라닌 잔기인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
4. 제 1항 내지 제 3항중 어느 한항에 있어서, 리파아제의 입계위치에 위치한 아미노산 잔기는 트립토판과 상이하며, 상기 아미노산 잔기는 트립토판 잔기에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
5. 제 1항 내지 제 4항중 어느 한항에 있어서, 모리파아제는 미생물 또는 포유류 리파아제중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
6. 제 5항에 있어서, 모리파아제는 이스트 리파아제인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
7. 제 6항에 있어서, 모리파아제는 칸디다 안락티카(Candida antarctica)의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
8. 제 7항에 있어서, 모리파아제는 C. antarctica의 리파아제 A인 것을 특징으로 하는

리파아제 변이체.

9. 제 8항에 있어서, 모리파아제의 페닐알라닌 139가 트립토판 잔기로 치환되어 있거나, 모리파아제의 페닐알라닌 135 및 139가 트립토판 잔기로 치환되어 있는 SEQ ID No.1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
10. 제 5항에 있어서, 모리파아제는 박테리아 리파아제인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
11. 제10항에 있어서, 모리파아제는 Pseudomonas의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
12. 제11항에 있어서, Ps. fragi의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
13. 제12항에 있어서, 모리파아제의 페닐알라닌 29가 트립토판 잔기로 치환되어 있는 SEQ ID No.3으로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
14. 제 5항에 있어서, 모리파아제는 균류 리파아제, 사람 리파아제, 쥐과 리파아제, 쥐 리파아제 또는 개속 리파아제중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
15. SEQ ID No.2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 C. antarctica로부터의 기타 물질이 없는 것을 특징으로 하는 C. antarctica 리파아제 A, 또는
  - 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
  - 2) 아미노산 서열 SEQ ID No.2를 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
  - 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1로 표시되는 전체 또는 부분

뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 상기 리파아제의 변이체.

16. SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 C. antarctica

리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열, 또는

1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,

2) 아미노산 서열 SEQ ID No.2 를 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의

에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는

3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1 로 표시되는 전체 또는 부분

뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한

뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 C. antarctica 리파아제 A의 변이체물 암호화하는

상기 DNA 서열의 변형.

17. 특허청구의 범위 제 1항 내지 제14항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체 또는

특허청구의 범위 제15항에 따른 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열로

이루어지는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.

18. 특허청구의 범위 제17항에 따른 DNA 구조체를 함유하는 것을 특징으로 하는 제조합

발현 벡터.

19. 특허청구의 범위 제17항에 따른 DNA 구조체 또는 특허청구의 범위 제18항에 따른

벡터에 의해 형질전환되는 것을 특징으로 하는 세포.

20. 제19항에 있어서, 예컨대 A. niger, A. oryzae 또는 A. nidulans 와 같은 Aspergillus

속에 속하는 균류 세포; 예컨대 S. cerevisiae 와 같은 Saccharomyces 의 균주, 또는

H. polymorpha 와 같은 Hansenula 속 또는 P. pastoris 와 같은 Phichia 속으로부터의

대립 작용성 이스트에 속하는 이스트 세포; 예컨대 B. subtilis, B. licheniformis 또는 B. lentus 와 같은 Bacillus의 균주, 또는 E. coli 와 같은 Escherichia 의 균주에 속하는 박테리아 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

21. 특허청구의 범위 제19항 또는 제20항에 따른 세포를 리파아제 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양하고, 계속해서 리파아제 변이체를 배양물로부터 회수하는 것을 특징으로 하는, 특허청구의 범위 제 1항 내지 제14항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체의 제조방법.

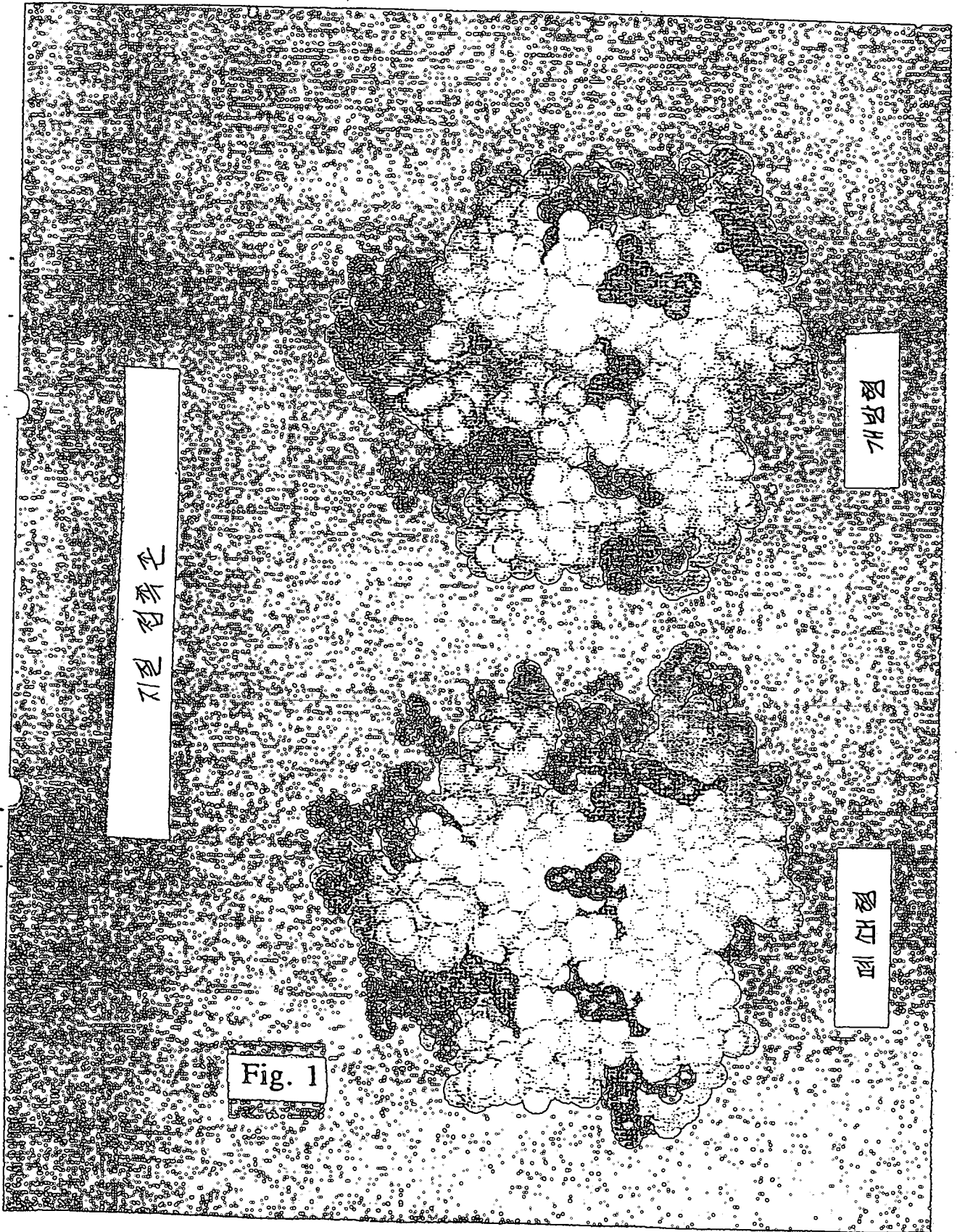
22. 에스테르 가수분해, 에스테르 합성 또는 에스테르 교환에 있어서 특허청구의 범위 제 1항 내지 제14항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체 또는 특허청구의 범위 제15항에 따른 C. antarctica 리파아제 A 또는 그 변이체의 사용.

23. 기계 펄프의 제조공정 또는 기계 펄프를 사용하는 제지공정에서 피치 문제들 피하기 위한 특허청구의 범위 제 1항 내지 제14항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체 또는 특허청구의 범위 제15항에 따른 C. antarctica 리파아제 A 또는 그 변이체의 사용.

## 요 약 서

본 발명은 리파아제 분자의 소수성이 뛰어난 긴 결합포켓에 위치하고, 리파아제 구조체의 지질접촉존의 입계위치에 위치한 활성 세턴과 방향족 아미노산 잔기와 상이하며 가수분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용하는 아미노산 잔기를 포함하는 트립신-유사 촉매 삼체를 포함하는 모리파아제의 리파아제 변이체에서, 모리파아제의 것과 비교하여 증가된 비활성도를 제공하기 위하여 상기 아미노산 잔기가 방향족 아미노산 잔기로 치환된 리파아제 변이체에 관한 것이다. 모리파아제는 SEQ ID No.2 로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 *C. antarctica*로부터의 기타 물질이 없는 *C. antarctica* 리파아제 A, 또는 (1) 리파아제 활성도를 가지고 있고, (2) 아미노산 서열 SEQ ID No.2 를 가지는 *C. antarctica* 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는 (3) *C. antarctica* 리파아제 A를 암호화하는 SEQ ID No.1 로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 상기 리파아제의 변이체일 수 있다.





시원 섬유층

외피층

중피층

Fig. 1

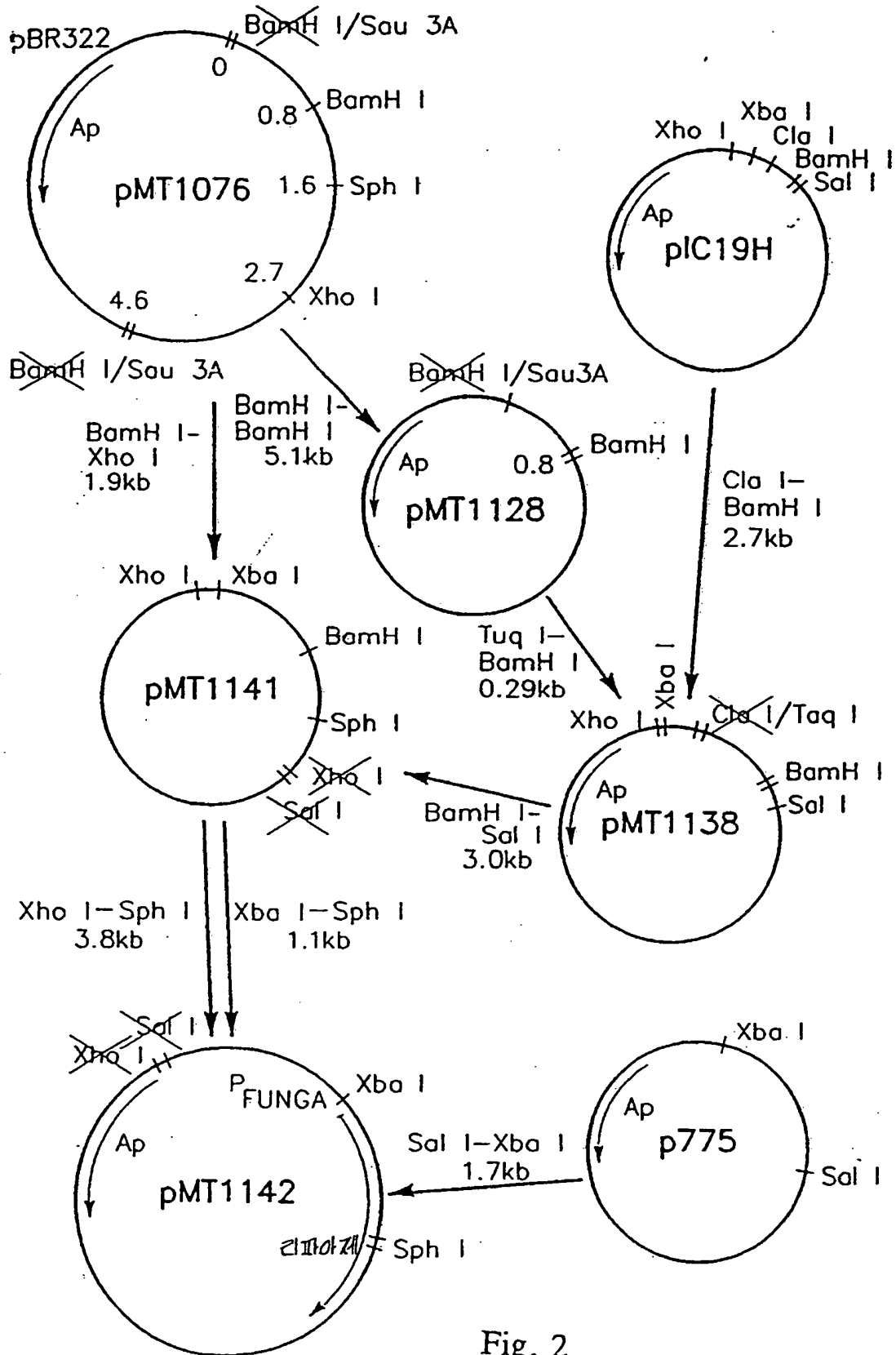


Fig. 2

3 - 2

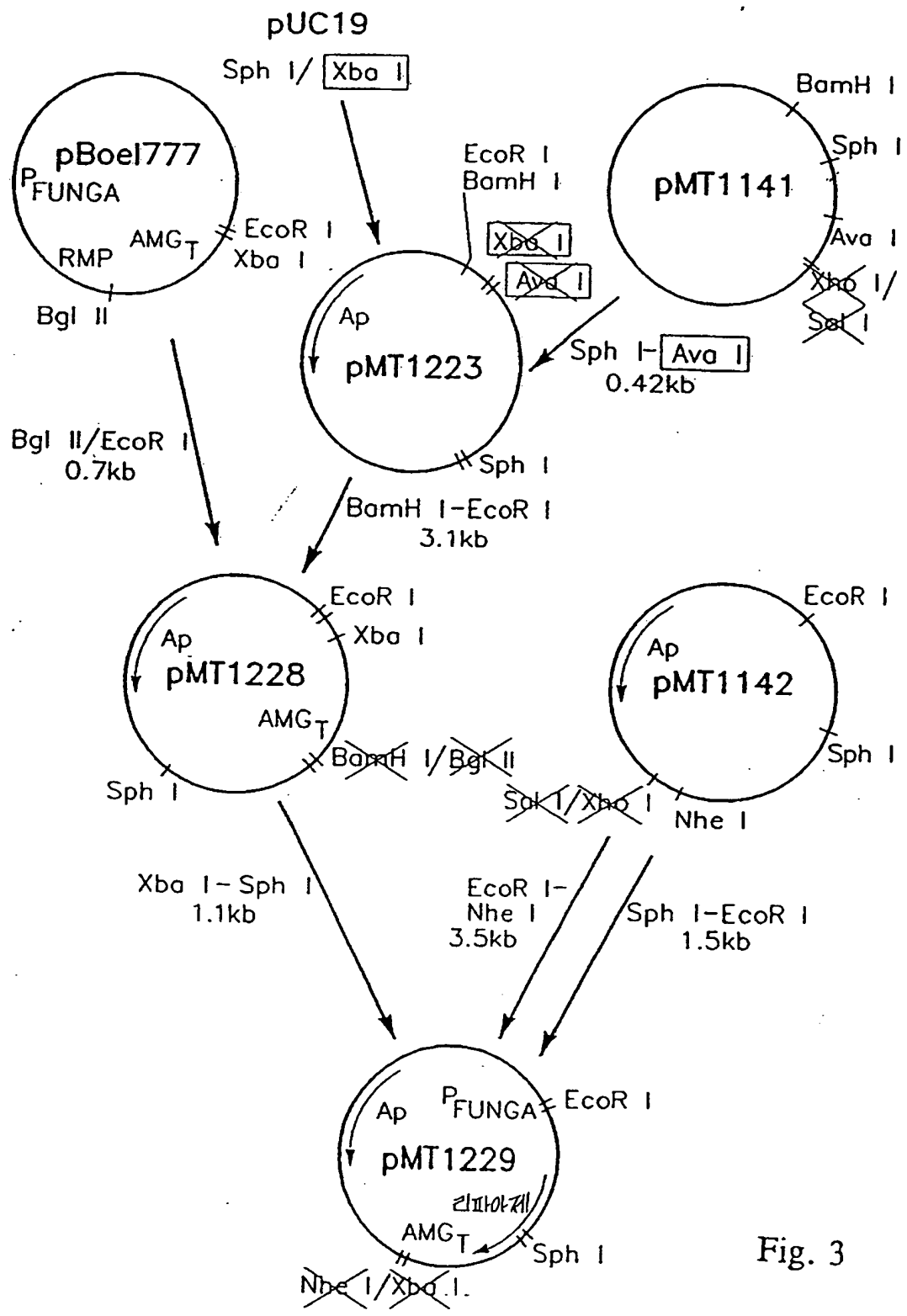


Fig. 3

Y. S. CHANG & ASSOCIATES  
K.P.O. Box 136, Seoul 110, Korea

**POWER OF ATTORNEY**

I/We, the undersigned, Novo Nordisk A/S

whose address is Novo Allé, DK-2880 Bagsvård, Denmark

hereby appoint Mr. Yong Shik CHANG, Jinsang JEONG  
registered Patent Attorney(s) in Seoul, Korea, as my/our attorney, with full power of substitution  
and revocation, to file with the Korean Industrial Property Office application(s) for the registration  
of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark entitled

C. ANTARCTICA LIPASE AND LIPASE VARIANTS  
(PCT/DK93/00225)

and further empower the said attorney(s) to file amendment, petition for the examination,  
withdrawal, abandonment or alteration of application, divisional application, withdrawal of  
application for the registration of extension of the patent term, and withdrawal of demands or  
requests, to make claim or withdrawal of the priority under Article 55-1 of the Patent Law  
(inclusive of application mutatis mutandis under Article 11 of the Utility Model Law), to file  
recordal of alteration of address or name of the applicant(s), transfer of right, opposition, trial,  
retrial, appeal against final rejection of application, decision for dismissing amendment or decision  
in the first trial, and renewal application, to raise petition or administrative suit against any  
administrative disposition of the Commissioner, to pay annuities or taxes, to represent me/us in a  
litigation relating to the protection of industrial property or civil affairs, to do all lawful acts with  
and without relation to the justice that shall be taken at the court of justice or administrative  
authorities for the defense against infringements of industrial property, and to register as an  
administrator of patent/utility model/industrial design/trademark/service mark under Article 5 of  
the Patent Law, before and after the registration of such right(s).

This 24th day of November, 1994

Signed by: *Anne Secher*

(in block letters) Anne Secher

Title: Director, Corporate Patents

Novo Nordisk A/S

(No legalization required)

PRIORITY CLAIM				
Applicant	NOVO NORDISK A/S Novo Allé DK-2880 Bagsvaerd Denmark			
Attorney	Y. S. Chang	Code of Attorney	K020	
Application No. and Date	Application No. : 95-700043 Application Date : January 6, 1995			
Title of Invention	C. Antarctica Lipase and Lipase Variants			
Particulars of the Priority Document	Country	Kind of Appln.	Filing Date	Filing No.
	Denmark	Patent	Jul. 6, 1992	0888/92
<p>We are filing this Priority Document pursuant to Article 54 (4) of the Korean Patent Law.</p> <p style="text-align: center;">Date : Jan. 24, 1995</p> <p style="text-align: center;">Y. S. Chang Patent Attorney</p> <p>To : Commissioner Korean Industrial Property Office</p>				
Attached Document:	1. Translation of Danish Priority Document 1 Copy			

접수인란		(특허)우선권증명서류제출서		방식심사란	담당	심사관
출원인	성명	노보 노르디스크 아크티에 셀스카브 대표자 안네 제케르				
	주소	덴마크 디케이-2880 박스메르트 노보 알레				
	국적	덴마크				
대리인	성명	변리사 장용식	대리인코드	K020		
	주소	서울특별시 강남구 역삼동 824-20	전화번호	556-8224~6		
출원의 표시	출원번호	95년 특허출원 제700043호				
	출원일자	1995. 1. 6.				
발명의 명칭		칸디다 안탁티카 리파아제 및 리파아제 변이체				
우선권주장서류의 표시	출원국명	출원의종류	출원일자	출원번호		
	덴마크	특허	1992. 7. 6.	0888/92		
<p>특허법 제54조 제4항·실용신안법 제11조·의장법 제23조 제4항 및 상표법 제20조 제4항의 규정에 의하여 위와 같이 우선권증명서류를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">1995년 1월 24일</p> <p style="text-align: center;">대리인 변리사 장용식</p> <p>특허청장 귀하</p>						
<p>첨부서류:</p> <p>1. 덴마크 우선권서류 번역문 1통</p>						



# Kongeriget Danmark

**PRIORITY DOCUMENT**

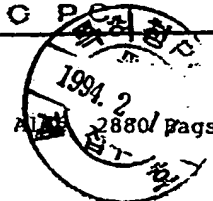
REC'D 02 AUG 1993

WIPG P

Patent application No. : 0888/92

Date of filing: 06 Jul 1992

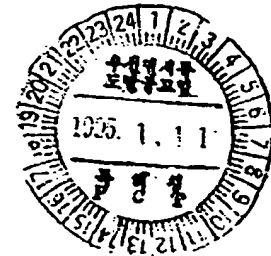
Applicant: Novo Nordisk A/S, Novo Allé 2880 Bagsværd, DK



This is to certify the correctness of the following information:

The attached photocopy is a true copy of the following document:

- The specification, claims and drawings as filed with the application on the filing date indicated above.



Industriministeriet  
**Patentdirektoratet**



TAASTRUP 20 Jul 1993

*Gurli Brehmer*  
Gurli Brehmer  
Kontorfuldmægtig

덴마크특허청

출원 번호: 0888/92

출원 일자: 1992년 7월 6일

출원인: 노보 노르디스크 아크티에 셀스카브  
덴마크 디케이-2880 박스베르트 노보 알레

발명의명칭: 리파아제 변이체

첨부된 사본은 출원한 것과 동일한 명세서와 도면임.

1993년 7월 20일

담당관 굴리 브래머

---

위 번역문은 원문과 상위없음  
변리사      장      용      식



리파아제 변이체

발명의 분야

본 발명은 개선된 성질을 갖는 신규의 리파아제 효소 변이체, 본 변이체의 발현을 위해 암호화하는 DNA 구조체, 이 DNA 구조체로부터 본 변이체를 발현할 수 있는 숙주 세포, 그리고 이 숙주 세포의 배양에 의해 본 변이체를 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본질적으로 순수한 칸디다 안락티카(Candida antarctica) 제조함 리파아제 및 그 변이체, 그리고 이 리파아제를 암호화하는 DNA 서열에 관한 것이다.

발명의 배경

아주 여러가지의 미생물 및 포유류 기원의 리파아제가 알려져 있다. 이들 리파아제중 많은 것의 아미노산 서열은 밝혀져 있고 그 촉미 기능에 중요한 구조 및 기능 요소에 관하여 분석되어 있다 (예컨대 Winkler et al., 1990 및 Schrag et al., 1991 참조). 지질 기질의 결합 및 활성화시 리파아제 효소는 형태 변화가 일어나서, 특히 활성 부위를 기질에 노출시키게 된다. 효소와 기질 사이의 추정된 상호작용과 함께 이러한 형태 변화가 특히 Brady et al., 1990, Brzozowski et al., 1991, Derewenda et al., 1992에 기재되어 있다.

많은 리파아제의 구조에 대한 지식에 기초하여, 제조함 DNA 범용 사용해서 개선된 성질을 가지는 리파아제 변이체를 구성하는 것이 가능했다. 그리하여 WO 92/05249에는 일정한 리파아제 변이체의 구성이 게시되어 있는데, 여기에서는 상이한 기질 특이성

을 갖고 및/ 또는 지질 기질로의 리파아제 활성부위의 개선된 접근성을 갖는 변이체를 제공하기 위해 지질 접촉존이 변형되었다. 이 변형은 아미노산 치환에 의하여 정전하, 소수성 또는 지질 접촉존의 표면 형태를 변화시키게 된다.

리파아제의 구조와 기능 관계는 상기 인용 참조문헌에 기재된 바와 같은 많은 연구의 주제가 되어 오긴 했으나, 연구는 주로 기질 결합 및 활성화시의 리파아제의 거시적 특징에 집중되어온데 반하여, 기질 결합 및 촉매 활성화에 실제로 관련된 아미노산의 동일성은 단지 그보다 적은 정도에만 검토되어 왔다.

### 발명의 개시

많은 리파아제의 구조 및 활성도에 관한 분석을 겸한 서열 정렬 분석에 의해, 본 발명자들은 현재 놀랍게도 리파아제의 입계 위치의 일정 아미노산, 특히 트립토판의 존재가 최적 촉매 활성화에 중요한 것으로 보임을 알았다.

따라서 본 발명의 목적은 입계 위치에 위치한 아미노산 잔기를 증대된 비활성도를 가지는 변이체가 생기게 하는 아미노산 잔기에 의해 치환함으로써 입계 위치에 그러한 아미노산 잔기를 포함하지 않는 리파아제 (본 명세서에서는 이 리파아제를 모 리파아제 (parent lipases)라고 부른다) 를 변형시키는 것이다.

보다 구체적으로, 한 양태에 있어서 본 발명은 리파아제 분자의 소수성이 뛰어난 긴 결합포켓에 위치하고, 리파아제 구조체의 지질접촉존의 입계위치에 위치한 활성 세린과 트립토판 상이하며 가수분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용하는 아미노산 잔기를 포함하는 트립신- 유사 촉매 삼체를 포함하는 모리파아제의 리파아제 변이체에서, 모리파아제의 것과 비교하여 증가된 비활성도를 제공하기 위하여 상기 아미노산 잔기가 트립토판 치환된 리파아제 변이체에 관한 것이다.

본 명세서에서 "트립신- 유사"란 많은 모리파아제가 트립신의 활성 부위에 상당하는 활성 부위에 촉매 삼체, 즉 아미노산 Ser, His 및 Asp, Glu, Asn 또는 Gln 중의 하나

를 포함하는 것을 가리켜 말한다.

지금까지 연구된 모든 리파아제는 리피아제가 비활성형일 경우 활성 세턴을 띠는 적어도 하나의 표면 루프구조체 (뚜껑 또는 덮개라고도 부름) 를 포함함을 알았다 (그러한 리파아제의 한 예가 Brady et al., 1990에 기재되어 있다). 리파아제가 활성화될 경우에는 그 루프 구조체가 이동되어, 표면을 만드는 활성부위 잔기들 노출시키는데, 이것은 증가된 표면 소수성을 가지며 가수분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용한다. 본 목적을 위해 이 표면은, 이 표면내에 위치하거나 이 표면의 일부를 형성하는 아미노산 잔기들 포함하여 말하는, "지질 접촉존" 이라고 부른다. 이들 잔기는 지질 표면과 접촉하여 활성화될 때 리파아제가 지질상으로부터 트리글리세리드를 가수분해하는 가수분해시 또는 가수분해동안 기질과 리파아제의 상호작용에 관여할 수 있다.

본원에서, 리파아제 분자의 "입체 위치" 란 리파아제 분자의 지질 접촉존내 위치로, 이 위치는 지질 기질과 상호작용하고 트립토판와는 상이한 아미노산 잔기가 차지하고 있다.

또 하나의 개념에 있어서 본 발명은 본질적으로 기타 C. antarctica 물질이 없고 제 1도로 확인된 아미노산 서열을 포함하는 C. antarctica 리파아제 A, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 제 1도로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오

티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 그 변이체에 관한 것이다.

본 발명의 C. antarctica 리파아제 A는 산성 pH에서의 활성 및 열안정성을 포함하여 많은 바람직한 성질을 가지고 있고, 예컨대 하기 절차를 이용하는 제조할 DNA 범에 의해 유리하게 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 리파아제 A는 WO 88/02775에 기재되어 있는 야생형 C. antarctica로부터 정제된 C. antarctica 리파아제 A보다 더 고순도로 그리고 더 다량으로 얻을 수 있다.

또한, 본 발명은 제 1도로 확인된 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열 또는 상기한 바와 같은 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 암호화하는 상기 DNA 서열의 변형에 관한 것이다.

본원에서는 "C. antarctica 리파아제 A"를 "리파아제 A"와 번갈아 사용하고 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 "리파아제 A 변이체"라고 부른다.

본 발명은 또한 위에 지적한 바와 같은 리파아제 변이체를 암호화하는 DNA 서열 또는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 구조체, 이 DNA 구조체를 함유하는 제조할 발현 벡터, 이 DNA 구조체 또는 발현 벡터에 의해 형질전환된 세포, 그리고 이 세포를 리파아제 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양하고, 그 후 배양물로부터 리파아제 변이체를 회수하는 본 발명 리파아제 변이체의 제조방법에 관한 것이다.

그 모리파아제와 비교하여 증가된 비활성도를 가지는 본 발명의 리파아제 변이체는 보다 높은 그 비활성도로 인해 유리하게도 보다 적은 양으로 그 모리파아제와 동일한

목적으로 사용될 수 있음은 물론이다.

따라서, 본 발명은 세계 호소로서의; 소화 호소로서의; 에스테르 가수분해, 에스테르 합성 또는 에스테르 교환에 있어서의 본 발명 리파아제 변이체의 사용; 또는 예컨대 기계 펄프 제조공정에서와 기계 펄프를 사용하는 제지 공정에서 발생하는 피치 문제를 피하기 위한 본 리파아제 변이체의 사용에 관한 것이다.

#### 발명의 상세한 설명

상기한 바와 같이, 본 발명자들은 리파아제 분자의 기질 접촉존에 위치하는 일정 방향족 아미노산, 특히 트립토판의 존재가 최적 촉매 활성에 중요함을 발견했다.

트립토판 잔기의 존재의 중요성은 지질 접촉존내의 입계위치, 즉 EP 0 305 216에 공개된 H. lanuginosa 리파아제의 아미노산 서열에서의 아미노산번호 89 에 트립토판 잔기를 포함하는 Humicola lanuginosa 리파아제의 돌연변이체에 관한 연구와 관련하여 밝혀졌다.

H. lanuginosa 돌연변이체에서 이 트립토판 잔기는 페닐알라닌, 티로신, 히스티딘, 이솔레우신, 글루탐산 및 글리신으로 각각 치환되었다.

이들 돌연변이체의 비활성도는 야생형 리파아제 100%로부터 페닐알라닌 돌연변이체 약 10% 까지 그리고 글리신 돌연변이체에 대해서는 약 2%에 이르기까지 증가함을 알았다 (위에 지시된 순서로).

몇몇 리파아제의 입계 위치는 지질 접촉존내의 어떤 위치인 것으로 생각되나, 입계 위치는 보통 리파아제 분자의 결합 포켓내에, 바람직하게는 그 가수분해 포켓내에 위치한다. 대부분의 리파아제에 대해서는 입계 아미노산 잔기가 활성부위의 정상 또는 부근에 위치한다고 여겨진다.

이 위치를 차지하는 아미노산 잔기는 당해 리파아제의 아미노산 서열을 다른 리파아제

의 아미노산 서열과 정렬시키고, 활성 세턴의 정상 또는 부근에 위치한 아미노산 잔기를 확인하여 추정된 상기 아미노산 잔기의 위치를 확인하는 서열 정렬에 관한 연구, 및/ 또는 2) 활성 세턴의 정상 또는 부근의 아미노산 서열을 확인하기 위한, INSIGHT 와 같은 표준 디스플레이 프로그램을 이용하는 당해 리파아제의 삼차원 구조에 관한 분석에 의해 어떤 리파아제에서든지 확인할 수 있다.

몇몇 리파아제에 있어서 임계 아미노산 잔기는 표면 루프 구조체내에 위치하거나 또는 리파아제가 하나 이상의 루프구조체를 포함한다면 하나 이상의 표면 루프구조체내에 위치한다.

임계 위치, 예컨대 활성 세턴의 정상 또는 부근에 존재하는 아미노산 잔기는 a) 리파아제의 활성화동안 리파아제 및 기질로부터 생성된 4 면 중간체의 안정화, 및 b) 비활성 효소에 있어 활성 세턴을 덮는 뚜껑 부위의 치환 활성화에 관련될 수 있다고 현재 믿어진다. 트립토판이 이 위치에 존재할 경우 상기 a)뿐만 아니라 b)에 관해서도 최적 성능이 얻어진다고 예기된다.

따라서, 트립토판은 가장 안정한 4 면 중간체의 생성이 있게 하고 (이것은 일어날 촉매 작용에 필요한 활성화 에너지의 저하를 의미한다), 일어날 어떤 촉매작용에 필수적인 뚜껑 개방의 활성화에 관련하여 효소의 성능을 더 개선한다고 여겨진다.

상기 a)와 관련하여 최상으로 작용하는 리파아제 변이체는 측쇄에 불포화 고리계를 함유하고 있음을 관찰했다. 단연 최대 불포화계는 트립토판이고, 그 다음에 티로신, 페닐알라닌 그리고 히스티딘이다. 이들 측쇄는 활성부위 히스티딘 내지 세턴으로부터 뚜껑 활성화 및 개방후 생성된 옥시아니온 구멍으로 양성자 전이가 일어난 4 면 중간체를 생성하기 위해 낮은 활성화 에너지를 초래하는 촉매작용에 있어서의 양성자 전이에 중요할 수 있는 파이전자계("불포화")를 가지고 있다.

상기 이론상의 설명으로부터 임계 위치, 예컨대 활성 세턴의 정상 또는 부근에 존재

할 최적 아미노산은 트립토판임을 알 수 있다. 그러나, 모리파아제가 이 위치에 어떤 방향족 아미노산 잔기 또는 측쇄에 불포화 고리계를 갖는 어떤 아미노산 잔기도 함유하지 않는 것일 경우에는, 그러한 아미노산이 이 위치에 치환되는 것이 유리할 수 있다.

따라서, 모리파아제가 임계 위치에, 측쇄에 불포화 고리계를 포함하지 않는 아미노산 잔기를 가지고 있을 경우에는, 그러한 불포화 고리계를 가지는 아미노산 잔기, 예컨대 방향족 아미노산 (트립토판, 티로신, 페닐알라닌 또는 히스티딘) 이 임계 위치에 치환될 수 있다. 모리파아제의 임계위치의 아미노산 잔기가 히스티딘일 경우는 페닐알라닌, 티로신, 가장 바람직하게는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있고, 아미노산 잔기가 티로신일 경우는 페닐알라닌, 가장 바람직하게는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있으며, 아미노산 잔기가 페닐알라닌인 경우는 트립토판으로 치환되는 것이 유리할 수 있다.

임계 위치는 보통 단 한개의 아미노산 잔기로 구성된다고 생각하고 있으나, 더 증가된 비활성도를 얻기 위해서는, 두개 이상의 잔기를 바람직하게는 위에서 설명한 바와 같이 트립토판 잔기에 의해 치환하는 것이 바람직할 수 있다.

임계 위치에 트립토판 잔기를 가지지 않는 모리파아제의 비활성도를 여기에 개시된 바와 같은 변형에 의해 적어도 2 배, 예컨대 적어도 3, 바람직하게는 적어도 4 또는 심지어 5, 6 또는 7 배 증가시키는 것이 가능하다고 기대된다.

증가된 기질 특이성을 가지는 여기에 정의된 바와 같은 리파아제 변이체는 각종 증가된 기질 특이성을 가지는 여기에 정의된 바와 같은 리피아제 변이체는 각종 기원의 모리파아제에 기초하여 제조할 수 있다고 기대된다. 따라서, 모리파아제는 미생물 리파아제 또는 포유류 리파아제일 수 있다.

모리파아제가 미생물 리파아제일 경우는 이스트, 예컨대 Candida, 리파아제, 박테리아,

예컨대 Pseudomonas, 리파아제 또는 균류, 예컨대 Humicola 또는 Rhizomucor 리파아제 중에서 선택될 수 있다.

한 바람직한 리파아제 변이체는 모리파아제가 Candida antarctica의 균주로부터 유도된 것, 특히 모리파아제가 C. antarctica의 리파아제 A인 것, 바람직하게는 SEQ ID No.2로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것 또는 여기에 정의된 바와 같은 그 리파아제 A 변이체이다. C. antarctica 리파아제 A의 리파아제 변이체는 모리파아제의 페닐알라닌 139가 트립토판 잔기로 치환된 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하다. 이 변이체의 구성 및 그 성질에 관한 분석은 실시예 3, 5 및 6에서 논한다.

본 발명의 리파아제 변이체는 상술한 바와 같이 Pseudomonas 중, 예컨대 Ps. fragi의 균주로부터 유도된 모리파아제에 기초하여 제조할 수 있다. 활성 세린의 정상 또는 부근에 위치한 트립토판과 상이한 아미노산 잔기를 가지는 적합한 Ps. fragi의 예는 Aoyama et al., 1988에 기재된 것이다. 본 발명에 따른 리파아제 변이체는 제 2도로 표시되는 상기 리파아제의 아미노산 서열중 페닐알라닌 잔기 29를 트립토판 잔기로 치환하여 구성할 수 있다.

본 발명의 리파아제 변이체의 구성을 위한 모리파아제로서 적합한 균류 리파아제의 예는 Rhizopus, 특히 R. delemar 또는 R. niveus로부터 유도된 것으로, 이 후자의 아미노산 서열은 예컨대 JP 64-80290에 게시되어 있다. 이 모리파아제로부터 본 발명에 따른 리파아제 변이체를 구성하기 위해서는, 위치 117의 알라닌 잔기가 트립토판과 같은 방향족 아미노산 잔기에 의해 치환되어야 한다. R. niveus 리파아제 서열



및 Rhizomucor miehei 리파아제 서열 (트립토판 잔기를 함유하는) 의 서열 정렬을 제 3도에 예시한다.

본 발명자들은 놀랍게도 위, 허 또는 간 리파아제와 같은 비췌장 리파아제는 리파아제 분자의 임계 위치, 보통은 활성 세탄의 정상 또는 부근에 위치하는 것으로 확인된 아미노산 잔기가 트립토판과 상이하다는 공통 특징이 있음을 발견했다. 이것은 일반적으로 이 위치에 트립토판 잔기를 가지는 것으로 밝혀진 췌장 리파아제와 대조적이다. 따라서 본원에서는 비췌장 포유류 리파아제를 본 발명 리파아제 변이체의 구성을 위한 "모리파아제"로서 사용하는 것이 유리할 수 있다.

따라서, 포유류 기원의 것인 여기에 개시된 바와 같은 리파아제 변이체는 위, 허 또는 간 기원과 같은 비췌장의 모리파아제로부터 제조되는 것이 유리하다. 그러한 포유류 리파아제는 사람, 쥐, 생쥐, 돼지, 개 또는 기타 포유류로부터 유도될 수 있다. 그러한 포유류 리파아제의 구체예로는 쥐 허 리파아제(Docherty et al., 1985), 쥐 간 리파아제(Komarony 및 Schotz, 1987), 사람 간 리파아제(Datta et al., 1988), 사람 위 리파아제(Bodmer et al., 1987), 및 Bio salt Activated Lipase(BSAL)(Baba et al., 1991)를 들 수 있는데, 이들 모두를 제 4도에 예시한 서열정렬분석으로 임계위치에 관하여 분석했다. 이 서열정렬연구에 포함된 췌장 리파아제는 쥐과 췌장 리파아제, (Grusby et al., 1990), 돼지 췌장 리파아제, (Caro et al., 1981), 사람 췌장 리파아제, A34494 (Love et al., 1989), 및 개속 췌장 리파아제(Mickel et al., 1989)였다.

상술한 바와 같이 본 발명은 또한 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는, 본질적으로 기타 C. antarctica 물질이 없는 C. antarctica 리파아제 A, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의

에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는

3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 제 1도로 표시되는 전체 또는 부분 누클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 누클레오티드 서열에 의해 암호화되는 그 변이체에 관한 것이다.

본원에서 "변이체"란 말은 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A로부터 유도된 리파아제 A 변이체, 또는 자연적으로 생기는 변이체를 가리켜 말한다. 일반적으로 이 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연리파아제 A와 상이한데, 이 잔기는 리파아제의 H 말단 끝 또는 C 말단 끝중의 하나 또는 둘다에서 삭제 또는 첨가되거나, 리파아제의 아미노산 서열내의 하나 이상의 부위에서 삽입 또는 삭제되거나, 리파아제의 아미노산 서열내에서 또는 그 한 끝이나 양 끝에서 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 치환되어 있을 수 있다.

또한, 본 발명의 변이체는 상술한 특징을 이루는 성질 1)-3) 중 한가지 이상을 가진다. 성질 1), 즉 변이체의 "리파아제 활성도"는 어떤 공지의 리파아제 평가분석, 예컨대 이후의 방법만에 기재한 표준 LI 평가분석을 이용하여 측정할 수 있다.

성질 2), 즉 이후의 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있거나 이에 대항하여 발생하는 항체와 본 발명 변이체의 반응성은 공지의 방법, 예컨대 본 발명의 C. antarctica 리파아제 A에 의한 토끼의 면역에 의해 생성된 다클론성 항체에 의해 측정할 수 있다.

항체 반응성은 본 기술분야에 공지된 평가분석을 사용하여 측정할 수 있는데, 그 예는 웨스턴 블로팅(Western Blotting) 또는 방사상 면역확산 평가분석이다.

혼성화를 수반하는 상기 성질 3)은 그 아미노산 서열이 제 1도로 확인된, C. antarctica

리파아제 A를 암호화하는 전체 또는 부분 cDNA 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브를, 표준 혼성화 조건, 예컨대 50°C에서 6×SSC 하에 수행되는 혼성화 실험에서 혼성화 프로브로서 사용하여 실행할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프로브가 제조되는 것에 기초한 뉴클레오티드 서열은 편리하게는 제 1도로 표시되는 DNA 서열이다.

상기한 바와 같이, 추가 양태에 있어서 본 발명은 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열, 또는

- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 제 1도로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 암호화하는 상기 DNA서열의 변형에 관한 것이다.

DNA 서열의 적당한 변형의 예는 암호화 효소의 또 다른 아미노산 서열은 생기게 하지 않으나, DNA 서열이 도입되어 있는 숙주 유기체의 코돈 사용에 상당할 수 있는 뉴클레오티드 치환, 또는 상이한 아미노산 서열을 생기게 하나, 효소의 상술한 성질을 손상하지 않는 뉴클레오티드 치환이다. 가능한 변형의 다른 예는 서열에 하나 이상의 뉴클레오티드 삽입, 서열의 한 끝에서 하나 이상의 뉴클레오티드 첨가 및 서열의 한 끝 또는 서열내에서 하나 이상의 뉴클레오티드 삭제이다.

#### 본 발명의 리파아제 변이체 제조방법

유전자에 돌연변이를 도입하기 위한 몇가지 방법이 본 기술분야에 알려져 있다.

리파아제- 암호화 DNA 서열의 클로닝에 관하여 간단히 논한 다음, 이 리파아제- 암호화 서열내의 특정 부위에서 돌연변이를 발생시키기 위한 방법을 논한다.

#### 리파아제를 암호화하는 DNA 서열의 클로닝

모리파아제 또는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열은 당업계에 잘

알려진 각종 방법에 의해 당해 리파아제를 생성하는 어떤세포 또는 미생물로부터 먼저 분리할 수 있다. 먼저 연구할 리파아제를 생성하는 유기체로부터의 염색체 DNA

또는 메신저 DNA 를 사용하여 게놈 DNA 및/ 또는 cDNA 라이브러리들 구성해야 한다.

그 다음, 리파아제의 아미노산 서열을 알았다면, 상등의 표지를 붙인 올리고뉴클레오타이드 프로브를 합성하여 박테리아 DNA 의 게놈 라이브러리로부터 또는 균류 cDNA 라이브러리로부터 리파아제- 암호화 클론을 확인하는데 사용할 수 있다. 대안으로, 박테리아 또는 균류의 또 다른 균주로부터의 리파아제와 상등인 서열을 함유하는, 표지를 붙인 올리고 뉴클레오타이드 프로브를, 보다 덜 엄격한 혼성화 및 세척 조건을 사용하여 리파아제- 암호화 클론을 확인하는데 프로브로서 사용할 수도 있다.

리파아제 생성성 클론을 확인하기 위한 다시 또 하나의 방법은 생성한 게놈 DNA 라이브러리에 의해 리파아제- 음성 박테리아를 형질전환시키는, 플라스미드와 같은 발현 벡터에 게놈 DNA 의 단편을 삽입하고, 그 다음 리파아제용 기질을 함유하는 한천상에 형질전환 박테리아를 띄우는 것을 수반한다. 리파아제- 함유 플라스미드를 함유하는 이들 박테리아는 본비 리파아제에 의한 기질의 소화로 인해, 깨끗한 한천의 후광으로 둘러싸인 콜론을 생성한다.

대안으로, 효소를 암호화하는 DNA 서열은 기정의 표준 방법, 예컨대 S.L. Beaucage 및 M.H. Caruthers. Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869 에 기재된 포스포아미디트법

이나 Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, pp. 901-805에 기재된 방법으로 합성하여 제조할 수도 있다. 포스포아미디트법에 따르면, 올리고뉴클레오티드는 예컨대 자동 DNA 합성 계도 합성, 정제, 어닐링, 결합 그리고 적당한 벡터로 클로닝시킨다.

최종적으로 DNA 서열은 표준기법에 따라, 전체 DNA 서열의 여러 부분에 해당하는 단편인, 합성계능 또는 cDNA 기원(적당한 것으로서)의 단편을 결합시킴으로써 제조된 혼합된 계능 및 합성, 혼합된 합성 및 cDNA 또는 혼합된 계능 및 cDNA 기원으로 되어 있을 수 있다. DNA 서열은 또한 예컨대 US 4,683,202 또는 R.K. Saiki et al., Science 239, 1988, pp. 487-491에 기재된 바와 같이, 특정 프라이머를 사용하는 폴리머라제 사슬반응(PCR)에 의해 제조할 수도 있다.

#### 리파아제-암호화 서열의 부위특이적 돌연변이 유발

일단 리파아제-암호화 DNA 서열을 단리하고 돌연변이에 바람직한 부위를 확인하면, 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 돌연변이를 도입할 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 소정 돌연변이 부위에 접하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 돌연변이 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 합성동안 삽입한다. 특정 방법에서는, 리파아제-암호화 서열을 가교하는 DNA의 단일가닥 갭을 리파아제 유전자를 함유하는 벡터내에 생성한다. 그 다음 소정 돌연변이를 함유하는 합성 뉴클레오티드를 단일가닥 DNA의 상동부분에 어닐링시킨다. 그 다음 남아 있는 갭을 DNA 폴리머라제 I(Klenow 단편)로 채우고, 구조체를 T4 리가아제를 사용하여 결합시킨다. 이 방법의 구체예는 Morinaga et al.(1984, Biotechnology 2: 646-639)에 기재되어 있다. 1988. 7. 26출원된 에스델의 미국특허 4,760,025호에는 카세트의 최소 변경을 행함으로써 다중 돌연변이를 암호화하는 올리고뉴클레오티드를 도입하는 것이 개시되어 있으나, 다양한 길이의 수많은 올리고뉴클레오티드가 도입될 수 있기 때문에, 모리나가(Morinaga)법에 의해 언제든지 한

때에 훨씬 더 다양한 돌연변이를 도입할 수 있다.

리파아제- 암호화 서열에 돌연변이를 도입하는 또 하나의 방법이 Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180 pp. 147-151 에 기재되어 있다. 그것은 PCR 반응에서

프라이머의 하나로서 화학적으로 합성한 DNA 가닥을 사용하여 도입된 소정 돌연변이를 함유하는 PCR 단편의 3 단계 발생을 수반한다. PCR 발생 단편으로부터, 돌연변이를 함유하는 DNA 단편을 제한 엔도뉴클레아제에 의한 분해에 의해 단리시켜 발현 플라스미드에 재삽입할 수 있다.

#### 리파아제 변이체의 발현

본 발명에 따르면, 상기한 방법 또는 당업계에 알려진 어떤 대체 방법에 의해 제조된 C. antarctica 리파아제 A- 암호화 서열 또는 돌연변이 리파아제- 암호화 서열은, 일반적으로 프로모터, 오퍼레이터, 리보솜 결합부위, 번역개시 시그널을 암호화하고, 임의로 리프레서 유전자 또는 각종 활성인자 유전자를 암호화하는 조절 서열을 포함하는 발현 벡터를 사용하여 효소형으로 발현시킬 수 있다. 발현 단백질의 분비를 가능케 하기 위해, "시그널 서열" 을 암호화하는 뉴클레오티드를 리파아제- 암호화 서열전에 삽입할 수 있다. 조절 서열 지도하의 발현을 위해서는, 본 발명에 따라 처리될 표적 유전자를 적당한 리딩 프레임내의 조절 서열에 사용가능하게 연결시킨다.

플라스미드 벡터에 혼입될 수 있고, 돌연변이 리파아제 유전자의 전사를 원조할 수 있는 프로모터 서열로는 원시핵생물의  $\beta$ - 락타마아제 프로모터(Villa-Komaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 3727-3731 및 락크 프로모터(DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 20-25)를 들 수 있으나 이것에 한정되지 않는다.

추가적 참조내용은 또한 "Useful proteins from recombinant bacteria", Scientific American,

1980, 242: 74-94에 있다.

한 구체예에 따르면, B. subtilis는 리파아제 A 또는 돌연변이 DNA 를 함유하는 발현 벡터에 의해 형질전환된다. 발현이 B. subtilis 와 같은 분비 미생물에서 일어나게 된다면, 시그널 서열은 번역계시 시그널에 뒤따르고 인터레스트의 DNA 서열에 선행할 수 있다. 시그널 서열은 그것이 분비시 발현 생성물로부터 분해되는 세포벽에 발현 생성물을 운반하는 작용을 한다. 위에서 정의한 "조질 서열" 이란 많은 존재할 경우 시그널을 포함하여 말한다.

본 발명의 리파아제 A 또는 리파아제 변이체를 제조하는 현재 바람직한 방법에서는, 숙주 유기체로서 섬유모양 균류를 사용한다. 섬유모양 균류 숙주 유기체는 편의상 제조할 단백질 제조용 숙주로서 이전에 사용되어온 것, 예컨대 A. niger, A. nidulans 또는 A. oryzae 와 같은 Aspergillus sp. 의 균주이다. 제조할 단백질의 제조에 A. oryzae 를 사용하는 것은 예컨대 EP 238 023에 광범위하게 기재되어 있다.

Aspergillus 에서의 리파아제 변이체의 발현을 위해, 리파아제 A 또는 리파아제 변이체에 대해 암호화하는 DNA 서열에 프로모터가 선행한다. 프로모터는 Aspergillus 에서 강한 전사활성을 발휘하는 어떤 DNA 서열이라도 좋고, 아밀라아제, 글루코아밀라아제, 프로테아제, 리파아제, 셀룰라아제 또는 당분해 효소와 같은 세포외 또는 세포내 단백질을 암호화하는 유전자로부터 유도될 수 있다.

적합한 프로모터의 예는 A. oryzae TAKA 아밀라아제, Rhizomucor miehei 아스파르트산

프로테이나아제, A. niger 중성  $\alpha$ -아밀라아제, A. niger 산안정성  $\alpha$ -아밀라아제, A. niger 글루코아밀라아제, Rhizomucor miehei 리파아제, A. oryzae 알칼리 프로테아제 또는 A. oryzae 트리오스 포스페이트 아이소머라아제를 암호화하는 유전자로부터 유도된 것들이다.

특히 숙주 유기체가 A. oryzae 일 경우, 본 발명의 방법에 사용하기에 바람직한 프로모터는 A. oryzae TAKA 아밀라아제 프로모터로, 이유는 그것이 A. oryzae 에서 강한 전사 활성을 발휘하기 때문이다. TAKA 아밀라아제 프로모터의 서열은 EP 238 023에 있다.

종료 및 폴리아데닐화 서열은 프로모터와 동일한 공급원으로부터 적당히 유도될 수 있다.

균류 숙주세포를 형질전환하는데 사용되는 방법은 EP 238 023에 기재되어 있는 바와 같은 것이 적당할 수 있다.

숙주 세포로부터 리파아제 A 또는 리파아제 변이체를 확실히 분비시키기 위해, 자연적으로 생기는 시그널 서열일 수 있는 시그널 서열 또는 그 기능부 또는 세포로부터의 단백질 분비를 제공하는 합성 서열이, 리파아제 변이체를 암호화하는 DNA 서열에 선행할 수 있다. 특히 시그널 서열은 Aspergillus sp. 아밀라아제 또는 글루코아밀라아제를 암호화하는 유전자, Rhizomucor miehei 리파아제 또는 프로테아제를 암호화하는 유전자,

또는 Humicola 셀룰라아제, 크실라아제 또는 리파아제를 암호화하는 유전자로부터 유도할 수 있다. 시그널 서열은 A. oryzae TAKA 아밀라아제, A. niger 중성  $\alpha$ -아밀라아제,

A. niger 산안정성  $\alpha$ -아밀라아제 또는 A. niger 글루코아밀라아제를 암호화하는 유전자로부터 유도되는 것이 바람직하다.



형질전환 숙주 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 Aspergillus 세포를 배양하는데 적합한 어떤 종류의 배지라도 좋다. 형질전환체는 보통 안정하고 선택 압력의 부재하에 배양할 수 있다. 그러나, 형질전환체가 불안정하다고 밝혀지면, 세포에 도입된 선택 마커를 선택에 사용할 수 있다.

숙주 세포로부터 분리된 숙성 리파아제 단백질은 세포를 배지로부터 원심분리 또는 여과에 의해 분리하고, 배지의 단백질 성분을 황산암모늄과 같은 염에 의하여 침전시키고, 이어서 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피법을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 배지로부터 편리하게 회수할 수 있다.

본 발명의 리파아제 변이체는 개선된 비활성도를 갖는, 그 모리파아제와 동일한 유형의 기질에 대해 활성이라고 기대됨은 물론이다. 따라서, 본 발명의 리파아제 변이체는 그 모리파아제와 동일한 목적에 유용하다고 기대된다.

따라서, 세계 효소로서 유용한 모리파아제로부터 제조된 본 발명의 리파아제 변이체는 세계 첨가제 또는 세계 조성물에 활성 성분으로서 사용할 수 있다.

본 발명 리파아제 변이체의 또 하나의 기대되는 사용은 예컨대 낭포성 섬유증의 치료에 있어서 소화효소로서이다.

본 발명의 리파아제 변이체, 특히 C. antarctica 리파아제의 변이체의 세번째 사용은 에스테르 가수분해, 에스테르 합성 및 에스테르 교환과 같은 리파아제가 촉매작용하는 공정에서이다. 이들 공정에서의 리파아제의 사용은 WO 88/02775(노보 노트디스크 A/S)에 상세히 기술되어 있으며, 이 내용은 여기에 참고로 기재한다. 또한, 본 발명의 리파아제 변이체는 예컨대 PCT/DK92/00025(노보 노트디스크 A/S)에 기재되어 있는 바와 같이, 기계필프 제조공정 또는 기계필프를 사용하는 제지공정에서 발생하는 피치문제를 피하는데 사용할 수 있으며, 이 내용은 여기에 참고로 도입된다.

다음에 본 발명을 첨부 도면을 참조하여 설명한다.

도면의 간단한 설명

이하에 본 발명을 첨부도면을 참조하여 설명한다.

제1A도는 숙성 C. antarctica 리파아제 A의 아미노산 서열을 예시하고,

제1b도는 C. antarctica 리파아제 A 프로프로호소의 아미노산 서열을 예시하고,

제1C도는 본 발명의 C. antarctica 리파아제 A의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산을 예시하고,

제 2도는 Aoyama et al., 1988 에 기재된 Ps. fragi 리파아제의 아미노산 서열이고,

제 3도는 R.niveus 리파아제의 입계위치들 측정할 수 있는 Rhizomucor miehei 리파아제 서열과 R.niveus 리파아제 서열의 아미노산 서열정렬이고,

제 4도는 다수의 포유류 췌장 및 비췌장 리파아제의 서열정렬을 예시하는데,

1)은 Baba et al., 1991에 기재된 Bio Salt Activated Lipase의 아미노산 서열이고,

2)는 Docherty et al., 1985에 기재된 위척 리파아제의 아미노산 서열이고,

3)은 Bodmer et al., 1987에 기재된 사람위 리파아제의 아미노산 서열이고,

4)는 Mickel et al., 1989에 기재된 개췌장 리파아제의 아미노산 서열이고,

5)는 Love et al., 1989에 기재된 사람췌장 리파아제의 아미노산 서열이고,

6)은 Grusby et al., 1990에 기재된 쥐과 췌장 리파아제의 아미노산 서열이고,

7)은 Caro et al., 1981에 기재된 돼지췌장 리파아제의 아미노산 서열이고,

8)은 Datta et al., 1988 에 기재된 사람간 리파아제의 아미노산 서열이고,

9)는 Komaromy et al., 1987에 기재된 쥐간 리파아제의 아미노산 서열이며,

제 5도는 C. antarctica 균주 LF058로부터 리파아제 A의 N말단 서열과, 올리고뉴클레오

티드 프로브 NOR 438 및 NOR 440의 뉴클레오티드 서열을 예시하고 (실시예1 참조),

제 6도는 본 발명의 C. antarctica 리파아제 A의 기방리딩 프레임을 갖는 뉴클레오티드 서열을 예시하고 (실시예 1참조),

제 7도는 본 발명의 C. antarctica 리파아제 A 및 정제된 야생형 리파아제 A의 아미노산 조성을 나타낸 표이고,

제 8도 및 제 9도는 발현 프라즈미드 pMT1229의 구조체에 대한 도식을 예시한다 ( 실시예 1참조 ).

특정 청구된 바와같은 본 발명의 범위를 여하튼 한정하도록 의도되지 않은 다음 실시예에 본 발명을 더 예시한다.

#### 재료

플라즈미드 및 미생물

pBoel777 (p777) (EP 0 489 718 에 기재됨)

p775 (이것의 구성은 EP 0 238 023에 기재됨)

pIC19H (Marsh et al., Gene 32 (1984), pp. 481-485)

pToC90 (WO 91/17243 에 기재됨)

Aspergillus oryzae A1560: IFD 4177

E. coli MT172 (K12 제한부족 E. coli MC1000 유도체)

#### 일반 방법

## 리파아제 유전자의 부위특이적 시험관내 돌연변이 유발

리파아제 유전자에 돌연변이를 도입하기 위한 WO 92/05249 에 기재된 새가지 서로 다른 접근법, 즉 Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984)에 기재된 올리고 뉴클레오티드 부위특이적 돌연변이 유발, Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989)에 기재된 바와 같은 PCR 법, 그리고 리파아제-암호화 영역의 두 제한 부위 사이의 단편을 소정 돌연변이를 함유하는 합성 DNA 단편으로 치환하는 소위 "카세트 돌연변이 유발" 법을 사용할 수 있다. 마지막 방법의 사용은 실시예 2 에 예시되어 있다.

## 리파아제 비활성도의 측정

리파아제 활성도는 기질로서 글리세린 트리부티레이트를, 에밀선화제로서 아라비아 고무 를 사용하여 평가분석했다. 1LU (리파아제 단위) 는 30°C, pH 7.0에서 분당 적정가능 부티르산 1 $\mu$ mol 을 유리시키는 효소의 양이다. 리파아제 활성도는 코펜하겐 라디오 미터의, 라디오미터 적정기 VIT90 을 사용하여 pH-스타트에 의해 평가분석했다. 이 평가분석의 추가적인 세부사항은 요청시 입수가 가능한 Novo Analytical Method AF 95/5에 있다.

## 실시예

### 실시예 1

#### Candida antarctica 리파아제 A의 클로닝

C. antarctica 균주 LF058 (= 부다페스트 조약의 협정하에 1986. 9. 29 에 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM)이 기탁하였고 또한 WO 88/02775 에 기재된 DSM 3855) 의 염색체 DNA 를, 동결 세포를 식염으로 분쇄하여 기방하고, 계속해서 본질적으로 Yelton

et al., (1984) 에 기재된 바와 같이 DNA 를 추출함으로써 제조했다. 정제 DNA 를 Sau3A 에 의해 부분적으로 절단하고, 아가로오스 겔 전기영동후 3-9kb 범위내의 단편을 단리했다. Sau3A 크기의 단편을 BamHI-절단 디포스포릴화 플라스미드 pBR322 (New England Biolabs)로 결합시켰다. 결합 혼합물을 E. coli MT172 로 영질전환시켰다. 대략 50,000개의 영질전환 E. coli 콜론을 얻었는데, 이중 80% 는 LF058 DNA 의 삽입물을 함유했다.

표준 콜론 혼성화법 (Maniatis et al., 1982)을 사용하여, 콜론을  $^{32}P$ -포스포릴화 올리고뉴클레오티드 프로브 NOR 440 으로 스크리닝했다. NOR 440 은 숙성 C. antarctica 리파아제 A (계 1도 참조) 로부터 결정된 N 말단에 기초한 재발생 (64) 17 체이다. 34 콜론은 덜 엄격한 조건 (41°C 및 6 x SSC)에서의 세척후 양성을 나타냈다. 플라스미드를 이들 콜론으로부터 제조하고 BstNI 에 의한 제한후 서던(Southern) 분석했다. 서던용 프로브는 콜론성 혼성화 (위 참조) 에 사용된 NOR 440 프로브 또는  $^{32}P$ -표지의 프로브 NOR 438 였다. NOR 438은 13 위치에서 염기가 이스트 및 섬유모양 균류에서의 코돈 사용에 기초하여 선택된 올리고뉴클레오티드 (게스머; guess mer) 이다.

추측 위치들을 표시함.

단 하나의 플라스미드, pMT1076 만이 덜 엄격한 조건 (위 참조) 에서 NOR 440 으로서 다소 더 엄격한 조건 (55°C 및 1 x SSC)에서 NOR 438 으로의 양자도 혼성화된 밴드를 함유했다.

pMT1076 의 제한 지도를 그리고 맥삼-길버트(Maxam-Gilbert) 법으로 DNA 서열을 결정했다. 개방 리딩 프레임은 SEQ ID No.1 로 표시된다. 이 개방 리딩 프레임 은 21 아미노산의 추정 시그널 서열을 암호화하고 (폰 하이네 규칙에 따라 (von Heijne,

G. (1986)), 더욱 숙성 리파아제의 N 말단에 선행하는 10 아미노산의 프로펩티드를 암호화하는 것으로 보인다. 프로펩티드의 마지막 두 아미노산은 Arg Arg, 즉 S. cerevisiae KEX-2형의 효소에 의한 내단백질 분해 처리에 대한 전형적 분해 부위이다.

DNA 서열에 의해 암호화된 성숙 단백질의 아미노산 조성은 C. antarctica 리파아제 A에 대해 측정된 아미노산 조성과 일치한다 (계 7도 참조).

계 2도 및 계 3도에 예시된 다수의 표준 플라즈미드 조작 (Maniatis et al., 1982) 을 통해, C. antarctica 리파아제 A의 개방 리딩 프레임을 A. oryzae의 알파-아밀라아제 프로모터와 A. niger의 글루코아밀라아제 전사 종료체 사이의 정확한 비향에 위치시켰다. 생성한 발현 플라즈미드 pMT1229를 EP 305,216에 기재된 바와 같이 A. oryzae A1560으로 형질전환시켰다. 형질전환체를 위에 인용한 특허에 기재된 바와 같이 단리하여 성장시키고 비양 상정액을 C. antarctica 리파아제 A의 존재에 대해 분석했다.

## 실시예 2

Candida antarctica 리파아제 A의 F135W 변이체를 발현시키는 플라즈미드의 구성

A 246 bp BamHI/BssHII 단편을, PCR 반응으로 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 3117을 사용하여 pMT1229의 서열에 기초해서 시험관내에 합성했다. 프라이머 3117은 별표를 한 135 phe 모돈 (TTC) 내지 trp 모돈 (TGG)에 BssHII 제한부위를 포함한다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 (F135W:256-276) (SEQ ID No. 8)  
 5'-CAG AAC GAG GCG GTG GCC GAC-3'

올리고뉴클레오티드 프라이머 3117 (F135W:566-487) (SEQ ID No. 9)  
 5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT TCG  
 TAG CCA GCG ATG AAG GCG GCT TTC\* C\*AG CCT TCG TG-3'

PCR 반응은 다음 성분들을 혼합하고 혼합물을 HYBAID™ 열반응기에서 배양하여 행했다.

주형 pMT1229	10 ng/μl	1 μl
H <sub>2</sub> O		46.5 μl
10 x PCR 완충제		10 μl
2 mM dATP		10 μl
2 mM dTTP		10 μl
2 mM dCTP		10 μl
2 mM dGTP		10 μl
프라이머 3116	50.5 pmol/μl	1 μl
프라이머 3117	70.5 pmol/μl	1 μl
Taq 폴리머라제		0.5 μl
파라핀유		50 μl
단계 I 94°C	2 분	1 사이클
단계 II 94°C	30 초	
50°C	30 초	30 사이클
72°C	2 분	
단계 III 72°C	5 분	1 사이클

생성한 310 bp 단편을 전기영동후 2% 아가로스 겔로부터 분리하고 BamHI 및 BssHII  
 제한 효소로 소화시켰다. 생성한 264 bp BamHI/BssHII 단편을 마찬가지로 2% 아가  
 로스 겔로부터 분리했다. 그 다음 이 단편을

pMT1229	BamHI/XbaI	0.3 kb
pMT1229	BssHII/SphI	0.5 kb
pMT1229	SphI/XbaI	5.0 kb

와 결합시켰다.

결합 DNA 를 E. coli 균주 MT172 로 형질전환시켰다 보정 삽입물물을 함유한 형질  
 전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀싱(Sequenase)(미합중국 바이오케미컬 (주))를  
 사용하여 결정했다. 하나의 생성 플라즈미드(pHE 1178)는 아미노산 위치 135에 돌연  
 변이를 함유했다 (phe 를 trp 로 돌연변이시킴).

pHE1178 을, 선택적 마커로서 A. nidulans 로부터의 andS 유전자를 포함한 pToC90과

함께 *A. oryzae* A1560 균주도 공동형질변환시켰다.

*oryzae* 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2 회 재단리시키고 안정한 형질전환체를 향 *Candida* 리파아제 A 항체를 사용하여 목젯 면역전기영동에 의해 특징을 지었다. 형질전환체에 의해 제조된 *Candida* 리파아제 A를 비활성도에 대해 더 분석했다.

### 실시예 3

*Candida antarctica* 리파아제 A의 F13PW 변이체를 발현시키는 플라스미드의 구성

A246 bp *Bam*HI/*Bss*HII 단편을, PCR 반응으로 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 3826을 사용하여 플라스미드 pMT1229 의 뉴클레오티드 서열에 기초해서 시험관내 합성했다. 프라이머 3826 은 별표를 한 139 phe 코돈 (TTC) 내지 trp 코돈 (TGG)에 *Bss*HII 제한부위 및 돌연변이를 포함한다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 은 실시예 2에 나타나 있다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3826 (F139W: 1020-941)

5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT  
TCG TAG CCA GCG ATC\* C\*AG GCG GCT TTG AAG CCT TCG TG-3'

PCR 반응을 실시예 2에 기재된 방법으로 행했다. 310 bp 단편을 전기영동후 2X 아가로오스 겔로부터 단리하고 *Bam*HI 및 *Bss*HII 제한효소에 의해 소화시켰다. 생성한

264 bp *Bam*HI/*Bss*HII 단편을 마찬가지로 2X 아가로오스 겔로부터 단리시켰다.

그 다음 이 단편을

pMT1229 *Bam*HI/*Xba*I 0.3 kb  
pMT1229 *Bss*HII/*Sph*I 0.5 kb  
pMT1229 *Sph*I/*Xba*I 5.0 kb

과 결합시켰다.

결합 DNA 를 *E. coli* 균주 MT172 로 형질전환시켰다.

보정 삽입물을 함유한 형질



전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀싱 (미합중국 바이오케미컬 (주))를 사용하여 결정했다. 하나의 생성 플라즈미드 (pME1229) 는 아미노산 위치 139에 돌연변이를 함유했다 (phe 를 trp 로 돌연변이시킴).

pME1229 를 선택적 마커로서 *A. nidulans* 로부터의 *amdS* 유전자를 포함한 pToC90과 함께 *A. oryzae* A1560 균주로 공동형질변환시켰다. *oryzae* 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2 회 재단리시키고 안정한 형질전환체 (MEA155) 의 효소활성도들 실시예 2에 기재된 바와 같이 기질로서 트리부틸렌을 사용하여 분석했다.

#### 실시예 4

*Candida antarctica* 리파아제 A의 F135W/F139W 변이체를 발현시키는 플라즈미드의 구성

A 246 bp BamHI/BssHII 단편을, PCR 반응에 의해 올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 및 4224를 사용하여 시험관내 합성했다. 프라이머 4224 는 별표를 한 135 및 139 코돈 (TTC) 내지 trp 코돈 (TGG)에 BssHII 제한부위 및 돌연변이를 포함한다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 3116 은 실시예 2에 나타났다.

올리고뉴클레오티드 프라이머 4224 (F135W: 1020-941)

5'-TTC TTG AGC GCG CGG ATG CCG TCG AGG ATA GCC ATG CCC TCT  
TCG TAG CCA GCG ATC\* C\*AG GCG GCT TTC\* C\*AG CCT TCG TG-3'

PCR 반응을 실시예 2에 있는 방법을 사용하여 행했다. 310 bp 단편을 전기영동후 2% 아가로오스 겔로부터 단리하고 BamHI 및 BssHII 제한효소에 의해 소화시켰다.

생성한 264 bp BamHI/BssHII 단편을 마찬가지로 2% 아가로오스 겔로부터 단리했다.

그 다음 이 단편을

pMT1229	BamHI/XbaI	0.3 kb
pMT1229	BssHII/SphI	0.5 kb
pMT1229	SphI/XbaI	5.0 kb

와 결합시켰다.

결합 DNA 를 E. coli MT172로 형질전환시켰다. 삽입물을 함유한 형질전환체를 선택하고 그 DNA 서열을 시퀀싱을 사용하여 결정했다. 한 결과생성 플라즈미드 (pHE1230) 는 아미노산 위치 135 및 139 에 두 돌연변이를 함유했다 (phe 를 trp 로 돌연변이시킴).

pHE1230 을, 선택적 마커로서 A. nidulans 토부터의 amdS 유전자를 포함한 pToC90과 함께 A. oryzae A 1560 균주로 공동형질변환시켰다. A. oryzae 형질전환체를 선택적 플레이트상에서 2 회 재단리시키고 안정한 형질전환체의 호소활성도를 실시예 5에 기재된 바와 같이 기질로서 트리부틸렌을 사용하여 분석했다.

#### 실시예 5

C. antarctica 리파아제 A 변이체 F139W 및 F135W/F139W 의 정제 및 그 모 아성형

C. antarctica 리파아제 A와 의 비활성도 비교

각각 실시예 3, 4 및 1 에 기재된 바와 같이 제조된 모리파아제 및 리파아제 변이체 들 다음의 4 단계 표준정제법을 사용하여 정제했다.

단계 1: 위 실시예 1 및 3 에 기재된 형질전환 A. oryzae 세포를 비양하여 얻은 리파 아제 및 리파아제 변이체 각각을 함유하는 발효즙을 원심분리하고, 상청액을 pH 7로 조절 했다. 이온강도를 2mS로 조절했다. DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia) 겔을 25mM 트리스(Tris) 아세트산염 완충제 pH 7에서 팽창시키고 평행이 되게 했다. 발효상청액 을 유리칼럼기상의 DEAE-Sephadex A-50에 통과시켰다. 리파아제 활성도를 가지는 페억 을 수집하고 0.8M 아세트산 암모늄으로 조절했다.

단계 2: 적당한 컬럼을 TSK 겔 ButylToyopearl 650C 로 채우고 0.8M 아세트산암모늄에

의해 평형이 되게 했다. 리파아제 활성도를 가지는 폐액을 걸름에 가했다.

걸함된 물질을 물로 용리시켰다.

단계 3: 그 다음 리파아제 함유 용리액을 Highperformance Q-Sepharose 걸름상에 가했다. 리파아제 활성도를 폐액으로서 수집했다. 이 방법으로 정제된 리파아제를 280nm 에서 1의 옵티컬 덴서티(Optical Density)로 농축시켰다.

리파아제의 순도를, 약 45 kD의 분자량을 갖는 한 띠를 보이는 SDS-PAGE에 의해 검사했다. 위 "일반 방법" 난에 기재된 방법을 사용하여 리파아제 활성도를 측정했다.

리파아제 변이체 F139W에 대해 1200 LU/OD<sub>280</sub>임에 비하여 야생형 모리파아제의 리파아제 활성도는 300 LU/OD<sub>280</sub>였다. 삼입 트립토판에 대한 보정을 안한 OD<sub>280</sub> 흡수에 의거, 돌연변이체의 비활성도는 사용된 평가분석에서 적어도 4배 더 높았다. 리파아제 변이체 F135W/F139W의 리파아제 활성도는 140 LU/OD<sub>280</sub>였다 (두 추가 트립토판에 대한 보정없이).

#### 실시예 8

*Candida antarctica* 리파아제 A 및 그 변이체 F139W의 열안정성

*C. antarctica* 리파아제 A 및 *C. antarctica* 리파아제 A 변이체의 열안정성을, 상이한 pH값에서 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimetry; DSC)에 의해 측정했다.

이 방법을 사용하여, 효소용액을 일정 프로그램된 속도로 가열하여 열변성온도 T<sub>d</sub>를 측정한다.

보다 구체적으로 말하면, MicroCal (주) 계 시차주사열량계 MC-2D를 연구에 사용했다. 아래 표를 참조하여 50mM 완충용액으로 효소용액을 제조했다. 0.6 내지 0.9mg/ml의 범위에 걸친 효소농도와 약 1.2ml의 총부피를 각 실험에 사용했다. 모든 시료를 25°C에서 90°C/hr의 조사속도로 가열했다.

분석에서 얻어진 결과를 아래 표에 나타낸다.

C. ant. 리파아제 A (WT)

pH	완충제 (50 mM)	변성온도 <sup>1)</sup>
4.5	아세트산염	96°C
5	아세트산염	95°C
7	TRIS	93°C

C. ant. 리파아제 A 돌연변이체 (F139W)

pH	완충제 (50 mM)	변성온도 <sup>1)</sup>
5	아세트산염	84°C
7	TRIS	82°C

<sup>1)</sup> 존재하는 효소분자의 대략 절반이 가열동안 열적으로 변성된 온도.

위 결과는 C. antarctica 리파아제 A 및 F139W 변이체의 열안정성에 대한 pH 최적치가 대단히 낮고 양 효소가 pH 7 이하에서 열적으로 매우 안정함을 보여준다.

연구범위내에서 야생형과 돌연변이 F139W 양자의 열안정성은 pH가 저하됨에 따라 계속 증가한다. 이 때문에 양 리파아제는 대단히 높은 온도와 비교적 낮은 pH값에서의 가수분해/ 합성에 아주 적합하다.

본원에 인용된 참조문헌

- Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor,  
1982,
- 5  
von Heijne, G. Nucl. Acid. Res. 14 (1986), pp. 4683-90
- Yelton et al., PNAS 81 (1984), pp. 1470-74
- 10  
Aoyama, S. et al., (1988), Cloning, sequencing and expression  
of the lipase gen from Pseudomonas fragi IFO-12049 in E.  
coli. FEBS Lett., 242, 36-40.
- Baba, T. et al., (1991), Structure of Human Milk Bile Salt  
15  
Activated Lipase. Biochemistry, 30, 500-510.
- Bodmer, M.W. et al., (1987) Molecular Cloning of a Human  
Gastric Lipase and Expression of the Enzyme in Yeast.  
Biochimica et Biophysica Acta, 909, 237-244.
- 20  
Caro, J.De. et al., (1981) Porcine Pancreatic Lipase.  
Completion of the Primary Structure. Biochim.Biophys. Acta  
671, 129-138.
- 25  
Datta, S. et al., (1988) Human Hepatic Lipase. J.Biol.Chem.,  
263, 1107-1110.
- Docherty, A.J.P. et al., (1985), Molecular Cloning and  
Nucleotide Sequence of Rat Lingual Lipase cDNA. Nucleic Acids  
30  
Research, 13, 1891-1903.
- Grusby, M.J. et al., (1990), Cloning of an Interleukin-4  
Inducible Gene from Cytotoxic T Lymphocytes and its  
Identification as a lipase. Cell 60, 451-459.
- 35  
Komaromy, M.C. et al., (1987), Cloning of Rat Hepatic Lipase

cDNA: Evidence for a Lipase Gene Family. Proc.Natl.Acad.Sci.,  
84, 1526-1530.

5 Lowe, M.E. et al., (1989), Cloning and Characterization of  
Human Pancreatic Lipase cDNA. J.Biol.Chem., 264, 20042-20048.

Mickel, F.S. et al., (1989), Structure of the Canine  
Pancreatic Lipase Gene. J.Biol.Chem., 264, 12895-12901.

10 Derewenda, Zygmunt S. et al., (1992?), Relationships Among  
Serine Hydrolases: Evidence for a Common Structural Motif in  
Triacylglyceride Lipases and Esterases.

15 Derewenda, Urszula et al., (1992?), Catalysis at the  
Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a  
Triglyceride Lipase. Biochem., 31, 1532-1541.

20 Schrag, J.D. et al., (1991), Ser-His-Glu triad Forms the  
Catalytic Site of the Lipase from Geotrichum candidum.  
Nature, vol. 351, 761-764.

Winkler, F.K. et al., (1990), Structure of Human Pancreatic  
Lipase. Nature, vol. 343, 771-774.

25 Brzozowski, A.M. et al., (1991), A Model for Interfacial  
Activation in Lipases from the Structure of a Fungal Lipase-  
inhibitor Complex. Nature, vol. 351, 491-494.

30 Brady, Leo et al., (1990), A Serine Protease Triad Forms the  
Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. Nature, vol  
343, 767-770.

## 특허청구의 범위

1. 리파아제 분자의 소수성이 뛰어난 긴 결합포켓에 위치하고, 리파아제 구조체의 지질접촉존의 입계위치에 위치한 활성 세틴과 트립토판 잔기와 상이하며 가수 분해시 또는 가수분해동안 지질 기질과 상호작용하는 아미노산 잔기를 포함하는 트립신- 유사 촉매 삼체를 포함하는 모리파아제의 리파아제 변이체에서, 모리파아제의 것과 비교하여 증가된 비활성도를 제공하기 위하여 상기 아미노산 잔기가 트립토판 잔기로 치환된 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
2. 제 1항에 있어서, 트립토판과 상이한 상기 아미노산 잔기는 리파아제 분자의 결합포켓에 위치하는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
3. 제 2항에 있어서, 트립토판 잔기와 상이한 상기 아미노산 잔기는 리파아제 분자의 가수분해 포켓에 위치하는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
4. 제 1항 내지 제 3항중 어느 한항에 있어서, 리파아제의 입계위치에 위치한 아미노산 잔기는 트립토판과 상이하며, 상기 아미노산 잔기는 트립토판 잔기에 의해 치환된 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
5. 제 1항 내지 제 4항중 어느 한항에 있어서, 트립토판 잔기와 상이한 상기 아미노산 잔기는 리파아제의 뚜껑 부위에 존재하는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
6. 제 1항 내지 제 5항중 어느 한항에 있어서, 트립토판 잔기와 상이한 상기 아미노산 잔기는 페닐알라닌 잔기인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
7. 제 1항 내지 제 6항중 어느 한항에 있어서, 모리파아제는 미생물 또는 포유류 리파아제중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
8. 제 7항에 있어서, 모리파아제는 이스트 리파아제인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.

9. 제 8항에 있어서, 모리파아제는 칸디다 안탁티카(Candida antarctica)의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
10. 제 9항에 있어서, 모리파아제는 C. antarctica의 리파아제 A인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
11. 제 7항에 있어서, 모리파아제의 페닐알라닌 139가 트립토판 잔기로 치환되어 있는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
12. 제 4항에 있어서, 모리파아제는 박테리아 리파아제인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
13. 제12항에 있어서, 모리파아제는 Pseudomonas의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
14. 제13항에 있어서, Ps. fragi의 균주로부터 유도되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
15. 제14항에 있어서, 모리파아제의 페닐알라닌 29가 트립토판 잔기로 치환되어 있는 제 2도으로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
16. 제 7항에 있어서, 모리파아제는 균류 리파아제인 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
17. 제 7항에 있어서, 모리파아제는 균류 리파아제, 사람 리파아제, 쥐과 리파아제, 쥐 리파아제 또는 개속 리파아제중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 리파아제 변이체.
18. 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 본질적으로 C. antarctica로부터의 기타 물질이 없는 것을 특징으로 하는 C. antarctica 리파아제 A, 또는
  - 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,



- 2) 아미노산 서열 SEQ ID No.1 을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 제 1도로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 상기 리파아제의 변이체.
19. 제 1도로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열, 또는
- 1) 리파아제 활성도를 가지고 있고,
- 2) 아미노산 서열 SEQ ID No.1 을 가지는 C. antarctica 리파아제 A의 적어도 하나의 에피토프와 반응이 있는 항체와 반응하고, 및/ 또는
- 3) C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 제 1도로 표시되는 전체 또는 부분 뉴클레오티드 서열에 기초하여 제조된 올리고뉴클레오티드 프로브에 의해 혼성화한 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 C. antarctica 리파아제 A의 변이체를 암호화하는 상기 DNA 서열의 변형.
20. 특허청구의 범위 제 1항 내지 제17항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체 또는 특허청구의 범위 제18항에 따른 C. antarctica 리파아제 A를 암호화하는 DNA 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 DNA 구조체.
21. 특허청구의 범위 제20항에 따른 DNA 구조체를 함유하는 것을 특징으로 하는 제조업 발현 벡터.
22. 특허청구의 범위 제20항에 따른 DNA 구조체 또는 특허청구의 범위 제18항에 따른 벡터에 의해 형질전환되는 것을 특징으로 하는 세포.

23. 제19항에 있어서, 예컨대 A. niger, A. oryzae 또는 A. nidulans 와 같은 Aspergillus 속에 속하는 균류 세포; 예컨대 S. cerevisiae 와 같은 Saccharomyces 의 균주, 또는 H. polymorpha 와 같은 Hansenula 속 또는 P. pastoris 와 같은 Phichia 속으로부터의 메틸 작용성 이스트이 속하는 이스트 세포; 예컨대 B. subtilis 또는 B. lentus 와 같은 Bacillus의 균주, 또는 E. coli 와 같은 Escherichia 의 균주에 속하는 박테리아 세포인 것을 특징으로 하는 세포.
24. 특허청구의 범위 제21항 또는 제23항에 따른 세포를 리파아제 변이체의 제조에 도움이 되는 조건하에서 배양하고, 계속해서 리파아제 변이체를 배양물로부터 회수하는 것을 특징으로 하는, 특허청구의 범위 제 1항 내지 제17항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체의 제조방법.
25. 세제 첨가제 또는 세제 조성물에 있어서 활성세제로서의 특허청구의 범위 제 1항 내지 제17항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체의 사용.
26. 에스테르 가수분해, 에스테르 합성 또는 에스테르 교환에 있어서 특허청구의 범위 제 1항 내지 제17항중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체 또는 특허청구의 범위 제18항에 따른 C. antarctica 리파아제 A 또는 그 변이체의 사용.
27. 제26항에 있어서, 리파아제 변이체가 특허청구의 범위 제 9항 내지 제11항 중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체인 것을 특징으로 하는 사용.
28. 기계 펄프의 제조공정 또는 기계 펄프를 사용하는 제지공정에서 피치 문제를 피하기 위한 특허청구의 범위 제18항에 따른 C. antarctica 리파아제 A 또는 그 변이체의 사용.
29. 제28항에 있어서, 리파아제 변이체가 특허청구의 범위 제 9항 내지 제11항 중의 어느 한항에 따른 리파아제 변이체인 것을 특징으로 하는 사용.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**